
TRATAT DE
MICRIOBOLIOIIE
GENERALA

G. ZARNEA

TRATAT de MICROBIOLOGIE GENERALĂ

**

VIROLOGIE GENERALĂ
ANATOMIE BACTERIANĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1983

CUPRINS

CREȘTEREA ȘI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

PRINCIPII DE SISTEMATICĂ ŞI TAXONOMIE A MICROORGANISMELOR

ORIGINEA ŞI EVOLUŢIA MICROORGANISMELOR

ARCHAEBACTERIA

PREFAȚA

Volumul al doilea al „Tratatului de microbiologie generală" reunește în partea intitulată „Fiziologia microorganismelor" unele probleme esențiale ale metabolismului producător de energie și de biosinteză, prezentarea principalelor tipuri de metabolism caracteristice microorganismelor, precum și procesul de creștere și de multiplicare a bacteriilor (multiplicarea microorganismelor eucariote urmînd să fie prezentată în volumul următor). Datorită unor condiții obiective, în mod deliberat, am acordat o pondere diferită capitolelor componente. În acest sens au fost prezentate foarte sintetic unele aspecte cu caracter mai general, accesibile în surse bibliografice comune, tratînd mai amplu procesele care evoluează cu particularități specifice microorganismelor, cele care au fost descoperite utilizînd microorganismele ca model experimental, care au o importanță deosebită pentru biologia lor sau care au suferit remanieri conceptuale în ultimii ani.

În continuare, sînt prezentate principiile generale de sistematică și taxonomie aplicate la bacterii și problema originii și evoluției microorganismelor. În acest context, sînt prezentate sintetic toate ipotezele de care am luat cunoștință în ultimii ani, cu dorința de a sublinia caracterul lor relativ, opunîndu-le tendinței de a considera una sau alta dintre aceste ipoteze ca definitivă. Este prezentată, de asemenea, semnificația descoperirii arhebacteriilor pentru biologia și sistematica bacteriilor, ca și pentru biologia generală.

Îndeplinesc o plăcută îndatorire mulțumind în mod deosebit colegului prof. dr. docent Mihai Șerban, referent științific al lucrării, pentru grija, minuțiozitatea și competența științifică cu care a studiat manuscrisul, pentru aprecierile făcute, ca și pentru sugestiile deosebit de interesante. De asemenea, mulțumesc cercetătoarei Anca Roșeanu pentru ajutorul dat cu competență și seriozitate și pentru discuțiile totdeauna interesante, purtate în cursul elaborării volumului. Lucrarea a beneficiat de talentul și inteligența graficianului Lucian Apetre, care a asigurat ilustrația, și de devotamentul Marianei Frățilă-Ciucă pentru ordonarea materialului imens utilizat pentru redactare și ilustrare. Ca și în cazul primului volum, mă simt profund îndatorat dr. Lucia Dumitru, care m-a ajutat pe parcursul elaborării întregului volum, cu competență, seriozitate și același spirit de ordine, fără al cărei ajutor elaborarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă.

Mulțumind tuturor colegilor care au apreciat primul volum al acestei lucrări, ne exprimăm speranța că volumul de față va fi util celor care vor să se dedice acestui domeniu și diferitelor categorii de specialiști din țara noastră. Cu acest gînd, vom primi cu recunoștință orice observație directă, colegială, privind conținutul și structura întregii lucrări.

AUTORUL

PREFAȚĂ

Volumul al doilea al „Tratatului de microbiologie generală" cuprinde în partea intitulată „Fiziologia microorganismelor" unele probleme esențiale ale metabolismului producător de energie și de biosinteză, prezentarea principalelor tipuri de metabolism caracteristice microorganismelor, precum și procesul de creștere și de multiplicare a bacteriilor (multiplicarea microorganismelor eucariote urmînd să fie prezentată în volumul următor). Datorită unor considerente obiective, în mod deliberat, am acordat o pondere diferită capitolelor componente. În acest sens au fost prezentate foarte sintetic unele aspecte cu caracter mai general, accesibile în surse bibliografice comune, tratînd mai amplu procesele care evoluează cu particularități specifice microorganismelor, cele care au fost descoperite utilizînd microorganismele ca model experimental, care au o importanță deosebită pentru biologia lor sau care au suferit remanieri conceptuale în ultimii ani.

În continuare, sînt prezentate principiile generale de sistematică și taxonomie aplicate la bacterii și problema originii și evoluției microorganismelor. În acest context, sînt prezentate sintetic toate ipotezele de care am luat cunoștință în ultimii ani, cu încercarea de a sublinia caracterul lor relativ, opunîndu-ne tendinței de a considera una sau alta dintre aceste ipoteze ca afirmații. Este prezentată, de asemenea, semnificația deosebită a arheobacteriilor pentru biologia și sistematica bacteriilor, ca și pentru biologia generală.

Îndeplinesc o plăcută îndatorire mulțumind în mod deosebit colegului prof. dr. docent Mihai Șerban, referent științific al lucrării, pentru grija, minuțiozitatea și competența științifică cu care a studiat manuscrisul, pentru aprecierile făcute, ca și pentru sugestiile deosebit de interesante. De asemenea, mulțumesc cercetătorului Ioan Rogozan pentru sprijinul dat cu competență și seriozitate și pentru discuțiile totdeauna interesante, purtate în cursul elaborării volumului. Lucrarea a beneficiat de talentul și meticulozitatea graficianului Lucian Alecu, care a asigurat ilustrația, și de devotamentul Marianei Frățilă-Căucă pentru ordonarea materialului imens utilizat pentru redactare și ilustrare. Ca și în cazul primului volum, mă simt profund îndatorat dr. Lucia Dumitru, care m-a ajutat pe parcursul elaborării întregului volum, cu competență, seriozitate și neobișnuit spirit de ordine, fără al cărui sprijin elaborarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă.

Mulțumind tuturor colegilor care au apreciat primul volum al acestei lucrări, ne exprimăm speranța că volumul de față va fi util celor care vor să se dedice acestui domeniu și diferitelor categorii de specialiști din țara noastră. Cu acest gînd, vom primi cu recunoștință orice observație directă, colegială, privind conținutul și structura întregii lucrări.

AUTORUL

FIZIOLOGIA MICROORGANISMELOR

„Dacă o bacterie funcţionează cu virtuozitate, aceasta se datorează faptului că strămoşii săi şi-au exercitat dibăcia în această chimie, timp de două miliarde de ani, notîndu-şi cu conştiinciozitate reţeta fiecărei reuşite".

F. JACOB

FIZIOLOGIA MICROORGANISMELOR

METABOLISMUL

Microorganismele, ca orice organisme vii, sînt sisteme specifice, complex organizate, dotate cu continuitate genetică, deci cu capacitatea de a se reproduce în mod independent. În cazul în care sînt aprovizionate cu hrană ele își sintetizează constituenții proprii, folosind pentru aceasta energia eliberată din degradarea enzimatică a substratului lor nutritiv. Prin urmare, microorganismele sînt capabile de o activitate fiziologică neîntreruptă, mai mult sau mai puțin intensă, în cursul căreia cresc, se divid și își modifică structura, compoziția chimică, poziția în mediu etc. Continuitatea acestor activități necesită prezența în mediul înconjurător a unor substanțe utilizabile în nutriție pentru sinteza constituenților celulari și procurarea energiei indispensabile fenomenelor vitale.

Metabolismul microorganismelor reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice implicate în activitatea lor biologică, prin intermediul cărora energia și elementele biogene, ca atare sau sub formă de combinații mai mult sau mai puțin complexe, sînt preluate din mediu și utilizate pentru biosinteză, degradare și creștere, ca și pentru alte diferite activități fiziologice secundare (mobilitate, luminescență etc.). Grație acestor reacții, substanțele din mediu sînt transformate în constituenți celulari, energie și produși de metabolism.

În ansamblu, diferitele reacții ale metabolismului îndeplinesc patru funcții esențiale pentru viața celulei și anume :

1) Eliberarea de energie și stocarea ei sub formă de ATP și alți compuși macroergici.

2) Producerea subunităților folosite pentru construcția constituenților celulari, pornind de la substanțele nutritive.

3) Activarea subunităților de construcție monomere pe seama energiei de legătură din compușii macroergici și formarea constituenților celulari macromoleculari, prin asamblarea monomerilor. Acest proces decurge, în unele cazuri (proteine, acizi nucleici, unele poliglucide), conform schemei de programare specifică reprezentată de informația genetică a celulei.

4) Formarea și degradarea biomoleculelor necesare anumitor funcții specializate ale celulei.

Aceste funcții sînt realizate printr-o rețea complexă și variată de căi metabolice, care funcționează perfect coordonat datorită intervenției unor reacții speciale („pace maker reactions" Krebs și Kornberg, 1957). Ele dirijează fluxul metaboliților pe căile individuale și datorită sensibilității lor față de nivelul intracelular al produșilor finali ai propriilor căi, ca și față de intermediarii altor căi, asigură coordonarea și autoreglarea diferitelor căi metabolice. Faptul că activitatea macromoleculelor implicate în reac-

ţiile „pace maker" — atît ca enzime-cheie ale căilor metabolice, cît şi ca agenţi de control ai transcrierii informaţiei genetice — poate fi inhibată sau stimulată de interacţiunea lor cu unele micromolecule furnizează bazele integrării multitudinii proceselor chimice, caracteristice organismelor vii.

Căile metabolice sînt secvenţe de reacţii chimice, catalizate enzimatic, care permit organismelor vii să obţină din nutrienţi, atît compuşii necesari pentru sinteza constituenţilor celulari, cît şi energia necesară pentru aceste sinteze, ca şi pentru alte procese care necesită consum de energie. Acest mod de funcţionare implică o legătură strînsă, intracelulară, între reacţiile producătoare şi cele care consumă energie, prin care degradarea substanţelor nutritive (care eliberează energie) furnizează, în acelaşi timp, compuşi ce pot fi utilizaţi ca blocuri de construcţie sau ca precursori ai blocurilor de construcţie pentru asamblarea macromoleculelor proprii celulelor.

Au fost descrise patru tipuri de căi metabolice: 1) căile catabolice; 2) căile anabolice; 3) căile amfibolice şi 4) căile anaplerotice.

CĂILE CATABOLICE

Procesele biochimice implicate în degradarea diferiţilor compuşi nutritivi din mediu şi eliberarea de energie în celulă sînt reunite sub denumirea de *catabolism*, iar reacţiile enzimatice implicate în degradare sînt numite *reacţii catabolice* (de dezasimilare). Eliberarea de energie prin degradarea, spre exemplu, a unei anumite surse de carbon se face printr-o succesiune de reacţii chimice, al căror număr şi complexitate reflectă complexitatea de structură a substanţei degradate. Ca regulă generală, procesele de catabolism evoluează în trei faze (fig. 1) succesive (Kornberg, 1965):

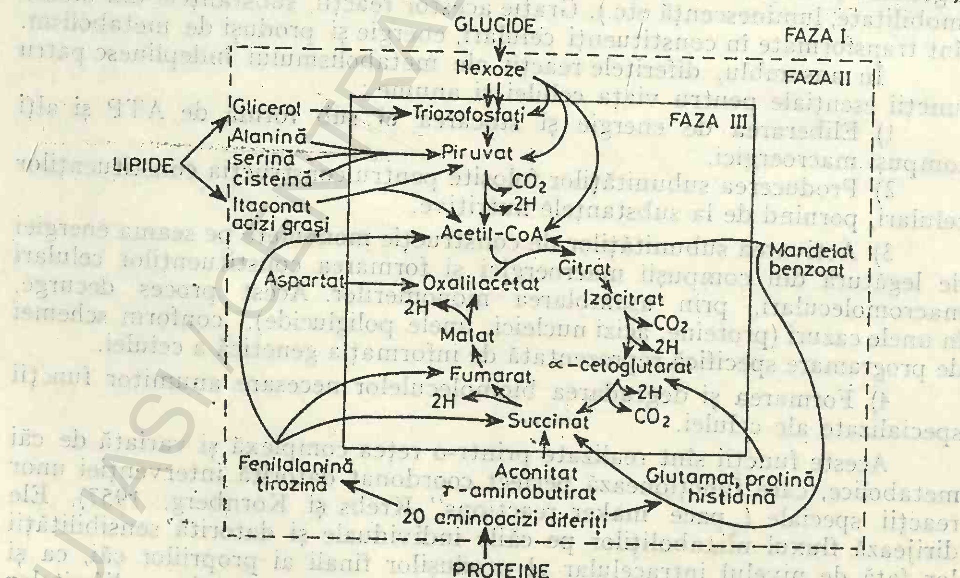


Fig. 1. — Cele trei faze ale proceselor de degradare în cursul metabolismului bacterian (după Kornberg, 1965).

Faza I corespunde degradării macromoleculelor la unităţile mici constitutive; astfel, proteinele sînt degradate la aminoacizi, glucidele la hexoze, lipidele la glicerol (sau alţi alcooli) şi acizi graşi etc. Se eliberează ~ 1% din energia totală a macromoleculelor, într-o formă neaccesibilă utilizării de către celulă, şi, ca atare, este pierdută sub formă de căldură.

Faza a II-a corespunde etapei în care diferitele micromolecule rezultate în faza precedentă sînt degradate incomplet, eliberînd ~ 1/3 din energia totală cu producerea — în afară de CO_2 şi H_2O — a unui număr relativ mic de produşi diferiţi, numiţi *intermediari metabolici ai căilor metabolice centrale*. În această fază, hexozele pot fi metabolizate pe căi diferite (calea glicolizei, calea Entner—Doudoroff sau calea hexozomonofosfatului), dar produşii obţinuţi final nu sînt foarte diferiţi, reprezentînd, cu excepţia CO_2, intermediari ai căilor metabolice centrale sau precursori ai lor. În mod similar, aminoacizii pot fi utilizaţi pe căi diferite, dar, indiferent de calea utilizată, catabolismul lor duce la formarea de acetil-CoA sau de intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs). Caracteristica esenţială a acestei faze decurge, deci, din faptul că, cu toată marea lor varietate căile catabolice duc de la sursele primare de carbon la acelaşi număr redus (~ 12) de intermediari ai căilor metabolice centrale (fig. 65, tabelul nr. 1).

Faza a III-a are o evoluţie diferită în funcţie de natura microorganismului studiat. În cazul microorganismelor aerobe, care pot metaboliza substraturile nutritive integral (pînă la CO_2 şi H_2O), calea majoră de desfăşurare a acestei faze şi de eliberare de energie este cea a ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs), cuplat cu fosforilarea oxidativă. Microorganismele care nu pot efectua conversia completă a surselor de C la CO_2 şi H_2O realizează această fază prin reacţii de fermentaţie (alcoolică, lactică, butirică, propionică, acetonobutilică etc.), în care produşii căilor catabolice servesc — direct sau indirect — ca donatori, respectiv acceptori de H, în secvenţe de reacţii de oxidoreducere cuplate. În aceste cazuri, cantitatea de energie utilă pentru celulă este mult mai scăzută, în raport cu cea eliberată în cursul respiraţiei aerobe, prin mecanismul fosforilării oxidative (Kornberg, 1965).

CĂILE ANABOLICE

Procesele de asimilare, corespunzînd anabolismului, se realizează prin secvenţe de reacţii enzimatice, care asigură folosirea intermediarilor căilor centrale ale metabolismului pentru sinteza blocurilor de construcţie, componente ale macromoleculelor. Căile anabolice au ca punct de plecare, de multe ori, intermediari ai căilor centrale, foarte diferiţi de cei care rezultă din catabolismul compusului respectiv.

Acest fenomen, ilustrat de numeroase exemple, se explică prin faptul că etapele enzimatice componente ale celor două tipuri de căi (catabolice şi anabolice) sînt diferite sau au cel mult numai o foarte mică asemănare. Spre exemplu, catabolismul serinei duce la formarea de piruvat, în timp ce sinteza ei începe de la 3-fosfoglicerat; histidina este catabolizată la α-cetoglutarat, iar sinteza ei este iniţiată de la ribozo-5-fosfat (Ames şi Hartman,

Tabelul nr. 1

Intermediarii căilor metabolice centrale, prezenți la intersecția dintre catabolism și biosinteze (după Brock, 1974)

Intermediarul	Originea catabolică	Rolul în biosinteză
Glucozo-1-fosfat	Glucoză, galactoză, polizaharide	Zaharul nucleozidelor
Glucozo-6-fosfat	Glicoliză	Pentoze, polizaharide de rezervă
Ribozo-5-fosfat	Calea pentozofosfat	Nucleotide, deoxiribonucleotide
Eritrozo-4-fosfat	Calea pentozofosfat	Aminoacizi aromatici
Fosfoenolpiruvat	Glicoliză	Sistemul fosfotransferazei (transportul zaharurilor), aminoacizi aromatici, gluconeogeneză, reacțiile anaplerotice (fixarea CO_2), sinteza acidului muramic
Piruvat	Glicoliză, fosfocetolază (fermentația pentozei)	Alanină, valină, leucină, reacțiile anaplerotice (fixarea CO_2)
Acid 3-fosfogliceric	Glicoliză	Serină, glicocol, cisteină
α-cetoglutarat	Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)	Glutarat, prolină, arginină, lizină
Succinil-CoA	Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)	Metionină, porfirine
Oxalilacetat	Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs), reacțiile anaplerotice	Acid aspartic, lizină, metionină, treonină, izoleucină
Dihidroxiaceton-fosfat	Glicoliză	Glicerol (lipide)
Acetil-CoA	Decarboxilarea piruvatului, oxidarea acizilor grași, degradarea pirimidinei	Acizi grași, izoprenoizi, steroli, lizină (2 C), leucină (2 C)

1963). Catabolismul fenilalaninei și al tirozinei are ca rezultat formarea de acetil-CoA, fumarat sau succinat, iar biosinteza lor are ca punct de plecare eritrozo-4-fosfatul și fosfopiruvatul (Umbarger și Davis, 1962). Această modalitate de evoluție a căilor catabolice și anabolice prezintă unele avantaje biologice notabile ca, de exemplu, posibilitatea reglării lor independente, care asigură o desfășurare eficientă în ambele direcții. Reglarea dublă este o caracteristică generală a tuturor căilor paralele, catabolice și anabolice.

La microorganismele eucariote, ca și la celulele vegetale și animale, poate exista o separare a căilor catabolice și anabolice, în compartimente diferite ale celulei, permițînd evoluția lor, simultană și independentă, în regiuni diferite ale celulei (spre exemplu, în mitocondrii și în citoplasmă);

Caracterul distinct al căilor metabolice rezultă și din faptul că enzimele implicate în trepte aparent identice în cursul anabolismului și catabolismului pot prezenta proprietăți diferite, care le conferă particularități proprii.

Căile catabolice și anabolice pentru două substraturi chimice date nu sînt complet reversibile și sînt numai parțial comune. Spre exemplu, degradarea glicogenului la acid lactic este catalizată de 12 enzime, dintre care numai 9 catalizează reacții reversibile; pentru celelalte trei căi, din considerente energetice, se folosesc căi ocolite, care implică enzime diferite și intermediari diferiți. Existența unor căi metabolice paralele pentru reacțiile producătoare de energie și pentru cele care consumă energie este o necesitate: degradarea unei molecule organice complexe este din punctul de vedere energetic un proces „la vale" („downhill") — căile catabolice formează ATP din ADP și Pi, pe seama energiei libere produsă în timpul degradării diferitelor molecule (în special prin procesul de fosforilare oxidativă); procesele de biosinteză sînt din punctul de vedere energetic procese „la deal" („uphill"), care necesită consum de energie și se însoțesc de degradarea ATP la ADP și Pi.

Ca și procesele de catabolism, reacțiile de biosinteză, corespunzînd căilor anabolice, se realizează tot în trei faze succesive, în sensul invers celor prezentate în fig. 1., respectiv prin utilizarea micromoleculelor precursoare produse în faza a III-a a catabolismului și conversia lor la molecule mai mari — blocuri de construcție (faza a II-a), care final sînt asamblate în macromolecule de proteine, glucide și lipide. Spre deosebire de căile catabolice, ale căror începuturi sînt multiple, dar definite ca punct de plecare (pornind de la mai multe proteine, glucide și lipide diferite), pentru ca să evolueze convergent spre anumite căi finale comune, căile anabolismului au ca punct de plecare un număr foarte limitat de molecule precursoare simple, de la care evoluează divergent și ramificat pentru a realiza gama largă de molecule ce caracterizează celulele vii.

CĂILE AMFIBOLICE

Căile catabolice și cele anabolice funcționează simultan în celule, sub forma unor secvențe de reacții catalizate de enzime și însoțite, la fiecare treaptă, de o modificare caracteristică, energetică. În felul acesta, spre exemplu, între catabolismul unui substrat organic și procesele de biosinteză se stabilesc, la modul general, două legături biochimice distincte:

1) În anumite trepte specifice ale căilor catabolice se eliberează o parte din energia chimică a metaboliților pentru a fi conservată sub formă de ATP, în timp ce în anumite trepte ale anabolismului, energia din ATP este utilizată pentru biosinteze.

2) Produșii căilor de catabolism funcționează nu numai ca intermediari în eliberarea treptată de energie, ci sînt punctul de plecare al unor reacții de biosinteză în care reprezintă precursori ai componenților celulari. În felul acesta, calea de catabolism a unui substrat organic funcționează,

cel puțin parțial, ca o cale de inițiere a unor reacții de biosinteză. Ciclul Krebs, spre exemplu, reprezintă nu numai o cale de oxidare totală a acetil-CoA, ci, în același timp, și o sursă importantă de intermediari (α-cetoglutarat, oxalilacetat, succinat) pentru căile de biosinteză. Datorită acestui fapt, el nu funcționează, niciodată, în ciclu închis, deoarece anumiți intermediari trec direct în căile de biosinteză.

Davis (1961) a propus denumirea generică de *căi amfibolice* (gr. amfi = = două) pentru a desemna căile metabolice centrale, care îndeplinesc, în același timp, funcția de eliberare de energie și de furnizare a unor precursori pentru biosinteze. Descoperirea lor a fost făcută de către Davis și Gilvarg (1956, 1961) prin studiul unor mutante de *E. coli* incapabile să formeze citrat, deci lipsite de posibilitatea de a oxida glucoza, dincolo de stadiul de acetat. Aceste mutante capabile să obțină energie prin glicoliză sînt lipsite însă de posibilitatea de a desfășura ciclul acizilor tricarboxilici și de a face sinteza acidului glutamic și a „familiei" de aminoacizi derivați din acesta (acidul glutamic, prolină, arginină). Ca urmare, ele nu se pot dezvolta pe medii lipsite de glutamat sau de α-cetoglutarat, dar cresc foarte bine pe medii care conțin ca unică sursă de C acidul glutamic sau precursorul său, prolina. În aceste condiții, deși formarea de citrat este blocată, reacțiile din acele părți ale căilor centrale neafectate de leziunea metabolică produsă prin mutație sînt suficiente pentru a furniza precursorii necesari pentru sintezele celulare.

În cursul creșterii mutantelor de *E. coli* pe glutamat, reacțiile căii Embden—Meyerhof nu mai funcționează ca reacții componente ale unei căi catabolice, ci evoluează cu o capacitate pur biosintetică (Davis, 1961; Kornberg, 1963, 1965).

CĂILE ANAPLEROTICE

Deoarece intermediarii căilor centrale amfibolice sînt în permanență îndepărtați, pe de o parte, în cursul fazei a III-a a catabolismului, cu eliberare de energie, și, pe de altă parte, prin utilizarea lor în diferite biosinteze, funcționarea multor cicluri este condiționată de asigurarea unei reaprovizionări permanente cu intermediarii utilizați, încetul cu încetul, pe parcursul desfășurării lor. Această funcție este asigurată de o serie de căi metabolice auxiliare — căile anaplerotice — diferite de cele ale catabolismului, reprezentate de una sau de mai multe etape catalizate enzimatic, care asigură completarea acestui deficit prin introducerea unor metaboliți în anumite cicluri metabolice esențiale.

Funcționarea și interacțiunile celor patru tipuri de căi metabolice au loc în mod perfect coordonat, datorită mecanismelor complexe care asigură reglarea activității lor, și adaptat la nevoile microorganismelor, determinate, în mare măsură, de compoziția mediului în care trăiesc. Evoluția căilor metabolice sub forma unor reacții secvențiale multiple conferă metabolismului o mai mare flexibilitate și diversitate, asigurînd, în același timp, eliberarea treptată a energiei și efectuarea interconexiunilor cu alte reacții ale metabolismului și în special cu cele de biosinteză. Cunoașterea

detaliată a modului de desfășurare a acestor căi și a interrelațiilor lor este importantă nu numai din punctul de vedere teoretic, ci mai ales pentru aplicațiile biotehnologice, în industria fermentațiilor și de biosinteză. Aceasta deoarece, în absența unor restricții deosebite pentru creștere (lipsă de nutrienți, prezența sau absența O_2, modificări defavorabile de temperatură etc., după caz), viteza de dublare a unei populații de microorganisme este determinată de echilibrul dintre rata aportului de metaboliți în căile centrale, de producerea de energie și de rata de intrare a metaboliților în căile anabolismului.

PARTICULARITĂȚILE GENERALE ALE METABOLISMULUI MICROORGANISMELOR

Natura și diversitatea nutrienților folosiți. Inițial s-a considerat în mod eronat, pe baza dimensiunilor și a relativei simplități a structurii microorganismelor, că activitățile lor biochimice ar fi în mod corespunzător rudimentare. Cercetările moderne de biochimie au demonstrat caracterul remarcabil de asemănător al căilor centrale ale metabolismului la toate formele de viață și faptul că microorganismele își realizează diferitele activități metabolice prin mecanisme similare sau, uneori, chiar mai complexe decît acelea implicate în metabolismul organismelor superioare. Capacitățile lor de sinteză sînt neobișnuit de mari, mergînd pînă la formarea tuturor constituenților celulari prin procese complexe, care pot avea ca punct de plecare chiar compuși anorganici ai C și N. Multiplicitatea reacțiilor, simplitatea și variabilitatea foarte largă a exigențelor nutritive, numărul mare de substanțe asimilabile și deosebita varietate a produșilor finali sînt dovezi ale unei remarcabile flexibilități fiziologice și ar atesta, după Burrows (1959), caracterul primitiv al unor astfel de forme de viață, care nu au suferit modificările survenite în cursul evoluției la celulele diferențiate ale organismelor superioare.

Considerate în ansamblu, microorganismele sînt organismele cele mai tipic omnivore dintre toate cele cunoscute, deoarece își pot realiza metabolismul folosind foarte numeroase și diferite surse de substanțe nutritive, de la N molecular, CO_2, S^0 pînă la substanțele organice complexe. Teoretic, aproape orice substanță din mediu, organică sau anorganică, din care se poate obține energie, este accesibilă metabolismului bacterian. Există microorganisme care pentru sinteza constituenților celulari pot folosi substanțe lipsite de orice înrudire structurală cu componentele chimice ale celulei sau sînt chiar toxice, substanțe și materiale ce acoperă o gamă largă de complexitate chimică, începînd de la acizii formic, oxalic și sulfuric pînă la fenoli, asfalt, parafine, petrol, chitină, piele, cauciuc, lemn și chiar substanțe antibiotice. Aceste particularități explică faptul că deși în natură au fost depuse numeroase produse de uzură și de excreție, ca și numeroase cadavre și reziduuri, acestea nu s-au putut acumula, ci după descompunerea lor de către microorganisme au fost reintroduse în circuitul elementelor biogene.

În lumea bacteriilor există însă și mari diferențe individuale sub raportul potențialului biochimic în sensul că, unele specii, ca, de exemplu, cele

din genul *Pseudomonas* pot utiliza ca unică sursă de C și energie 70—200 de substanțe chimice diferite, în timp ce altele sînt foarte „specializate", utilizînd numai un număr foarte limitat de nutrienți. Astfel, bacteriile metilotrofe utilizează numai metanul și metanolul, bacteriile celulozolitice numai celuloza, *Nitrosomonas* numai NH_3 și O_2, iar *Bacillus fastidiosus* numai acidul uric și compușii purinici înrudiți. Bacteriile sulfatreducătoare (*Desulfovibrio desulfuricans*) nu utilizează ca sursă de C decît un număr limitat de compuși organici (lactat, piruvat și acizi dicarboxilici cu C_4) și, spre deosebire de majoritatea bacteriilor, nu metabolizează nici un glucid și nici un aminoacid, cu excepția cisteinei. Diferitele grupuri sistematice de bacterii se caracterizează, deci, prin anumite particularități metabolice, în așa fel încît, în afara unor nutrienți folosiți de toate microorganismele (apă, CO_2, săruri minerale etc.), unele specii sau grupuri fiziologice de specii au nevoie și de anumite substanțe nutritive specifice, indispensabile pentru realizarea metabolismului celular.

„Plasticitatea" metabolismului microorganismelor este o altă particularitate, decurgînd din capacitatea acestora de a se adapta la tipul și cantitatea de nutrienți diferiți, prezenți în mediu. *E. coli*, spre exemplu, utilizează nu numai glucoza și NH_3 ca sursă de C și N, ci și o gamă largă de nutrienți, incluzînd diferite alte glucide, glicerol, etanol, acetat etc., respectiv purine, pirimidine, aminoacizi, datorită echipamentului enzimatic complex, care asigură conversia tuturor acestor substanțe în compuși care pot intra în căile metabolice centrale. Metabolismul său evoluează după principiul unei maxime economii („optimality") în folosirea enzimelor și a nutrienților: bacteriile se dezvoltă mai repede în prezența aminoacizilor, decît pe medii cu NH_4^+, pentru că nu mai este nevoie să se facă sinteza acestora. Cînd ambii produși sînt prezenți concomitent în mediu, bacteria utilizează preferențial aminoacizii preformați și stopează sinteza lor, pentru ca atunci cînd sînt epuizați și enzimele care participă la sinteza lor sînt din nou necesare, formarea lor să fie reluată și odată cu aceasta producerea de aminoacizi proprii de la NH_3.

Diversitatea mecanismelor enzimatice și a produșilor. Microorganismele pot utiliza același substrat nutritiv pe mai multe căi distincte sau parțial intricate, fiecare dintre ele putînd să ducă, în funcție de natura microorganismului, la formarea de produși diferiți. Oxidarea glucozei, spre exemplu, se poate face pe calea glicolizei (calea Embden—Meyerhof—Parnas), pe calea hexozomonofosfatului sau pe calea Entner—Doudoroff. Metabolizarea aminoacizilor, degradarea compușilor aromatici sau biosinteza diferiților produși se pot realiza, de asemenea, printr-o mare varietate de căi. Diferitele căi metabolice pot coexista la același microorganism și se pot substitui una celeilalte, în funcție de condițiile fiziologice și/sau de mediu.

Intensitatea metabolismului bacterian. Una din caracteristicile distinctive ale activităților metabolice microbiene este intensitatea lor excepțională comparativ cu aceea a activităților omologe ale organismelor superioare. Astfel, activitatea respiratorie a unui gram (raportat la greutatea uscată) de bacterii aerobe este de cîteva sute de ori mai intensă decît aceea a omului, iar potențialul metabolic al microorganismelor din cei 25 cm superficiali ai solului, de pe o suprafață de un hectar, este echivalent cu acela al cîtorva zeci de mii de oameni. După datele lui Burchard, 1 g

de celule de *Micrococcus ureae* descompune 180—1 200 g uree pe oră, iar după Haecke, 1 g de bacterii lactice hidrolizează circa 178—14 890 g lactoză pe oră, în funcţie de condiţiile de mediu. Chiar dacă aceste date sînt aproximative, ele ilustrează capacitatea metabolică imensă a acestor vieţuitoare caracterizate, în plus, printr-o aptitudine cu totul deosebită de a supravieţui în condiţii de viaţă foarte variate. Pentru a atinge un asemenea nivel de activitate metabolică, fapt reflectat atît prin viteza de catabolizare a diferite substraturi, cît şi prin aceea a biosintezelor, organismul uman ar avea nevoie de mai multe mii de tone de alimente pe oră. O celulă de *E. coli*, care se divide la interval de o oră, sintetizează pe secundă 4 000 de molecule de lipide, aprox. 1 000 tipuri de proteine (fiecare avînd 300 aminoacizi) şi 4 molecule de ARN (Nester, 1973). Randamentul potenţial teoretic al biosintezei proteinelor (kg/zi) este apreciat de Rivière (1980) la 1 pentru bovine, 10 pentru plantele de soia, 10^5 pentru levuri şi 10^{11} pentru bacterii. Aceasta, pentru că timpul de dublare al masei celulare este de ~ 15 minute la foarte multe bacterii heterotrofe (*E. coli, Welchia perfringens, S. faecalis*) şi de aprox. 24 de ore (de ~ 95 ori mai lung) pentru celulele de mamifere în culturi de ţesuturi.

Pentru a explica această particularitate a microorganismelor au fost incriminate o serie de cauze, ca: varietatea extraordinară a reacţiilor pe care le pot realiza, raportul cantitativ material genetic/citoplasmă şi activitatea enzimatică deosebit de ridicată a unor sisteme enzimatice bacteriene, comparativ cu cele provenite din ţesuturile vegetale sau animale (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Activitatea enzimatică comparativă a unor extracte bacteriene şi tisulare (după Gunsalus şi Shuster, 1961)

Enzima sau sistemul	Bacteria	Activitatea specifică*	Ţesutul	Activitatea specifică*	Raportul bacterie/celule animale sau vegetale
Oxidarea piruvatului	*Proteus vulgaris*	2,9	Muşchi pectoral de porumbel	0,1	29
Oxidarea α-cetoglutaratului	*E. coli*	0,62	Inimă de porc	0,23	2,7
Succinicthiokinaza	*E. coli*	3,0	Spanac	0,013	230
Încorporarea leucinei	*E. coli*	0,03	Ficat	0,0016	19
Butiril-CoA-dehidrogenaza	*Clostridium kluyverii*	0,4	Ficat	0,001	400

* = μmoli/mg proteină/oră.

O atare intensitate a activității biologice, puțin comună în lumea vie, este posibilă, în bună parte, și datorită suprafeței foarte mari a celulelor microbiene în raport cu greutatea lor. Ca urmare, aceste organisme au o suprafață foarte largă de contact cu mediul înconjurător, deci de schimb de substanțe între celulă și mediu, precum și o serie de proprietăți fizico-chimice caracteristice sistemelor coloidale. Pe de altă parte, în natură ar exista, după Luria (1960) și Stanier (1970), o regulă conform căreia viteza metabolismului, de care depinde viteza creșterii, ar fi invers proporțională cu mărimea organismului. Ca atare, cu cît corpul unui organism este mai mic cu atît metabolismul său este mai intens și creșterea sa mai rapidă (tabelul nr. 3).

Tabelul nr. 3

Relația dintre mărimea relativă a unor celule și coeficientul metabolic (după Gunsalus și Shuster, 1961)

Organismul sau țesutul	Volumul celulelor (cm³)	QO_2*)	Q_G**)
Ficat de șobolan	—	9	0,15
Creier de șobolan	—	14	0,9
Saccharomyces cerevisiae	10^{-10}	40—80 (glucoză)	3,0
Streptococcus faecalis	10^{-12}	186 (piruvat)	13
E. coli	10^{-12}	800 (acetat)	19
Azotobacter vinelandii	10^{-12}	4 200 (acetat)	—

*) QO_2 = µl/mg greutate uscată/oră.
**) Q_G = µmoli glucoză utilizați/mg greutate uscată/oră.

Privit în ansamblu, metabolismul microorganismelor este caracterizat printr-o remarcabilă diversitate și individualitate a nutrienților consumați pe diferite căi metabolice. Dar, cu toate aceste mari variații individuale, el este caracterizat printr-un grad foarte evident de ordine și simplitate în paternul (modelul) metabolic și printr-o zonă centrală („căile metabolismului central"), care prezintă o remarcabilă similaritate la cele mai multe forme de viață și în care se realizează o legătură directă între căile catabolismului și cele de biosinteză.

NUTRIŢIA MICROORGANISMELOR

Microorganismele, ca toate organismele vii, au nevoie pentru creştere şi multiplicare, ca şi pentru toate celelalte manifestări ale activităţii lor biologice, de prezenţa în mediul înconjurător a unor substanţe nutritive, care să conţină, pe de o parte, elementele chimice necesare pentru sinteza constituenţilor celulari, pentru activitatea enzimelor şi sistemelor de transport, iar, pe de altă parte, să le furnizeze substanţele necesare pentru producerea de energie biologic utilă. Cele mai multe cunoştinţe referitoare la exigenţele de nutriţie ale microorganismelor sînt rezultatul unor studii de laborator. Din cauza caracterului foarte heterogen al mediilor naturale şi dificultăţilor de a pune la punct tehnici de identificare şi dozare a diferitelor substanţe prezente în jurul celulelor bacteriene se cunosc foarte puţine date referitoare la procesele lor de nutriţie în natură. Mediile de cultură utilizate în practică conţin, într-o formă adecvată tipului de nutriţie al fiecărui microorganism, nutrienţii esenţiali pentru sinteza de material celular şi pentru producerea de energie *in vitro*, care condiţionează procesul de creştere şi multiplicare. Ele includ în mod obligatoriu, pe lîngă o serie de ioni anorganici, diferiţi compuşi ai C, H, O, N, P, S etc.

BIOELEMENTELE

Microorganismele au nevoie pentru creştere de aceleaşi elemente biogene întîlnite în structura oricărui sistem biologic.

Bioelementele majore (macroelementele) şi anume: C, O, H, S, P, K, Mg, Ca şi Fe, sînt necesare în concentraţii relativ mari ($> 10^{-4}$ M). Dintre acestea, C, O, H, N, S şi P formează $\sim 95\%$ din greutatea celulară uscată a bacteriilor şi reprezintă, ca atare, constituenţii majori ai biomasei celulare a microorganismelor. În plus, macroelementele îndeplinesc funcţii cu semnificaţie esenţială în metabolism şi, în general, în viaţa microorganismelor (tabelul nr. 4).

Astfel, sulful este necesar pentru sinteza unor aminoacizi (cisteină şi metionină) şi a unui număr de coenzime, în timp ce fosforul intră în structura acizilor nucleici, a fosfolipidelor, a acizilor teichoici, precum şi a unor nucleotide ca ATP, GTP, NAD^+ şi FAD (Gottschalk, 1979). Celelalte patru elemente majore (K, Mg, Ca şi Fe) sînt ioni metalici necesari

Tabelul nr. 4

Bioelementele majore necesare pentru nutriția microorganismelor. Sursele și funcțiile lor în metabolism (modificat după Gottschalk, 1979)

Elementul	Sursa	Funcția în metabolism
C	CO_2, compuși organici	Constituent al substanțelor organice celulare
O	O_2, H_2O, CO_2, compuși organici	Constituent al apei și al substanțelor organice celulare ; ca O_2, acceptor de electroni în respirația aerobă
H	H_2, H_2O, compuși organici	Constituent al apei celulare și al substanțelor organice
N	NH_4^+, NO_3^-, N_2, compuși organici	Constituent al proteinelor, acizilor nucleici și coenzimelor
S	SO_4^{2-}, HS^-, S^0, $S_2O_3^{2-}$, compuși organici cu S	Constituent al cisteinei, metioninei, tiaminpirofosfatului, coenzimei A, biotinei și acidului lipoic
P	HPO_4^{2-}	Constituent al acizilor nucleici, fosfolipidelor, coenzimelor și nucleotidelor
K	K^+	Principal cation anorganic celular. Cofactor al unor enzime
Mg	Mg^{2+}	Important cation celular. Cofactor al multor enzime (ex. kinaze) ; prezent în pereții celulari, membrane și esteri fosfați ; funcționează în legarea enzimelor de substraturi ; constituent al clorofilelor
Ca	Ca^{2+}	Cation celular important ; cofactor al enzimelor ; prezent în exoenzime (amilaze, proteaze) și dipicolinat de Ca (component important al endosporilor)
Fe	Fe^{2+}, Fe^{3+}	Prezent în citocromi, ferredoxine și alte proteine cu FeS ; cofactor al enzimelor (unele dehidrogenaze)

(cofactori) pentru activitatea enzimelor sau intră, ca elemente, în compoziția complexelor metalice. Spre exemplu, fosfolipoproteidele peretelui celular bacterian sînt chelate cu ioni de magneziu, în timp ce mulți esteri biologic activi ai fosfatului sînt prezenți în celulă sub forma unor complexe cu Mg. Calciul intră în structura unor exoenzime (amilaze, proteaze etc.) și a dipicolinatului de Ca, caracteristic endosporilor bacterieni. Ionii feros și feric fac parte din structura unor purtători redox, cum sînt citocromii și proteinele FeS.

Bioelementele minore (microelementele sau micronutrienții, „trace elements") (Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W și Ni) sînt necesare în cantități foarte mici, unele (Zn și Mn) ca elemente esențiale pentru toate microorganismele, în timp ce altele (Se, Mo, Co, Cu și W) numai pentru unele activități metabolice speciale (tabelul nr. 5).

Tabelul nr. 5

Bioelementele minore necesare pentru nutriţia microorganismelor. Sursele şi funcţiile lor în metabolism (după Gottschalk, 1979)

Elementul	Sursa	Funcţia în metabolism
Zn	Zn^{2+}	Prezent în alcool dehidrogenază, fosfatază alcalină, aldolază, ARN- şi ADN-polimerază
Mn	Mn^{2+}	Prezent în superoxid dismutaza bacteriană, cofactor al unor enzime (PEP-carbokinază, citrat sintetază)
Na Cl	Na^{+} Cl^{-}	Necesare bacteriilor halofile în concentraţii mari
Mo	MoO_4^{2-}	Prezent în nitrat reductază, nitrogenază, formiat dehidrogenază
Se	SeO_3^{2+}	Prezent în glicocol reductază şi formiat dehidrogenază
Co	Co^{2+}	Prezent în enzimele care conţin coenzime B_{12} (glutamat mutază, metilmalonil-CoA-mutază)
Cu	Cu^{2+}	Prezent în citocrom oxidază şi oxigenaze
W	WO_4^{2-}	Prezent în unele formiat dehidrogenaze
Ni	Ni^{2+}	Prezent în urează ; necesar pentru creşterea autotrofă a bacteriilor care oxidează hidrogenul

Zincul este necesar deoarece ADN- şi ARN-polimerazele sînt metaloproteide cu zinc, în timp ce molibdenul intră în constituţia nitrogenazei, enzimă esenţială pentru procesul de fixare biologică a azotului. Cobaltul participă la efectuarea reacţiilor metabolice dependente de vitamina B_{12}, iar cuprul intră în structura unor enzime care transferă electroni de la nivelul unui substrat la oxigen (Gottschalk, 1979). În timp ce nevoia de bioelemente majore este uşor de evidenţiat, chiar în cazul ionilor minerali (K, Mg, Ca şi Fe), care trebuie incluşi obligatoriu în mediu, nevoia esenţială de cobalt, mangan, cupru, molibden şi zinc este greu de demonstrat, deoarece aceşti ioni sînt prezenţi sub formă de contaminanţi ai sărurilor minerale utilizate la prepararea mediilor de cultură sau pot proveni din apă şi / sau sticlăria de laborator. Datorită acestui fapt, nevoia de anumite microelemente nu poate fi dedusă, uneori, decît indirect (spre exemplu, prezenţa vitaminei B_{12} implică nevoia de Co^{2+} în mediu). Nevoia de sodiu nu poate fi, de asemenea, demonstrată la cele mai multe bacterii. Sodiul este necesar în concentraţii relativ mari bacteriilor marine (halofile), ciano-

bacteriilor („alge albastre-verzi") și bacteriilor fototrofe, la care nu poate fi înlocuit de alți cationi monovalenți. Unele microelemente au un rol stimulator pentru creșterea microorganismelor. Spre exemplu, seleniul și tungstenul stimulează dezvoltarea bacteriei *Methanococcus vannielii*, cultivată pe formiat (Jones, 1977).

Nevoia de ioni minerali variază cantitativ și calitativ de la un microorganism la altul, în primul rînd, datorită diferențelor de constituție enzimatică și de eficacitate a mecanismelor de concentrare activă a lor din mediu. Unele enzime necesită prezența specifică a unui singur ion, care face parte integrantă din centrul ei activ. De foarte multe ori însă, activarea totală a unor enzime necesită prezența a doi sau mai mulți ioni metalici diferiți. Izocitritaza din *Pseudomonas aeruginosa* poate fi activată, spre exemplu, de oricare din ionii de Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} sau Co^{2+} (Mc Elroy, 1954).

În plus, unii factori de mediu pot contribui la această variabilitate prin : 1) înlocuirea funcțională, parțială sau completă, a unui ion cu altul în mediul de cultură ; 2) ocolirea („shunt"-area) efectivă a unui proces catalizat de o metaloenzimă, prin adăugarea produsului ei în mediu ; 3) prezența în mediu a unor compuși organici complecși, capabili să lege ioni metalici (agenți chelatori) ; 4) creșterea necesității pentru un ion esențial printr-un ion antagonist. Spre exemplu, nevoia crescută de K^+, evidențiată la unele microorganisme în prezența unui exces de Na^+, reflectă existența în celulele respective a mai multor enzime, care nu sînt active decît în prezența K^+ și pentru care Na^+ acționează ca un ion inhibitor competitiv.

SURSA DE CARBON

În funcție de natura sursei de carbon folosită pentru creștere și multiplicare, microorganismele formează două mari grupuri : 1) *microorganismele autotrofe*, care folosesc CO_2 ca unică sau ca principală sursă de C celular și 2) *microorganismele heterotrofe sau organotrofe*, la care substanțele organice servesc, în același timp, ca sursă de C pentru biosinteze și producere de energie. Termenii de autotrof și heterotrof au fost inițial utilizați pentru a caracteriza și diferenția nutriția plantelor de nutriția animalelor. Ei au fost folosiți mult timp și pentru a caracteriza tipurile de nutriție ale microorganismelor.

Practica a demonstrat însă, că marea varietate a tipurilor nutriționale întîlnite la microorganisme nu poate fi exprimată numai în funcție de natura sursei de C. În consecință, au fost adăugate criterii suplimentare ca : natura sursei de energie și natura substanțelor folosite ca donatori de hidrogen (sau de electroni). În cazul microorganismelor care folosesc diferite substanțe organice, rolul de sursă de energie este asigurat prin faptul că oxidarea sau dezasimilarea lor se face cu eliberare de energie utilă pentru celulă și eliberarea unei mari varietăți de produși de metabolism, de exemplu, CO_2 (produsul major al metabolismului respirator) sau ca un amestec de CO_2 și compuși organici (în cazul metabolismului fermentativ). În același timp, compușii organici utilizați ca nutrienți sînt folosiți ca punct de plecare pentru sinteza celor cîteva mii de substanțe organice constitutive, care sînt încorporate prin reacții consumatoare de energie în structura celulelor.

Există foarte mari diferențe în ceea ce privește natura și numărul compușilor care pot fi folosiți ca sursă de C. Nutriția heterotrofă poate fi simplă, ca la *E. coli*, care poate fi cultivată pe medii de cultură ce conțin

numai glucoză și săruri minerale, sau complexă, ca la *Lactobacillus* sp., care are nevoie de o serie de compuși organici, inclusiv de vitamine. Spre deosebire de autotrofe, care sînt capabile să sintetizeze constituenți organici pornind de la compuși anorganici simpli, heterotrofia implică incapacitatea de sinteză a unor metaboliți esențiali și, decurgînd din aceasta, necesitatea de a-i găsi ca substanțe preformate în mediu. Unele microorganisme heterotrofe au nevoi foarte specifice și nu se pot dezvolta decît în prezența unui singur compus organic, care le acoperă atît nevoile energetice, cît și pe cele biosintetice sau pe seama unui număr foarte limitat de compuși. *Bacillus fastidiosus* utilizează numai acidul uric, iar microorganismele celulozolitice numai celuloză; bacteriile metilotrofe folosesc numai metanul, metanolul și dimetileterii. Alte microorganisme, ca, de exemplu, bacteriile din genul *Pseudomonas*, folosesc o gamă foarte largă, de peste 100 de compuși organici cu C, care includ carbohidrați, polialcooli, acizi grași, acizi aminați, hidrocarburi, compuși aromatici etc., care pot fi folosiți ca precursori ai unor compuși organici, pe care nu sînt capabile să îi sintetizeze. Este probabil că toate microorganismele heterotrofe au nevoie și de CO_2 în cantități foarte mici pentru diferite reacții biosintetice. Dovada o constituie faptul că îndepărtarea completă a CO_2 împiedică sau inhibă creșterea microorganismelor respective în medii organice. Cel mai adesea, nevoile de CO_2 sînt acoperite de însuși metabolismul normal al substanțelor organice, care produce cantități importante de CO_2, fapt care face ca, în cele mai multe cazuri, lipsa CO_2 din mediu să nu apară ca un factor limitant al creșterii.

Există și excepții, reprezentate de unele bacterii și fungi microscopici, a căror dezvoltare heterotrofă este condiționată de prezența unei atmosfere bogate în CO_2 (5—10%). De această necesitate trebuie să se țină seama, mai ales în încercările de izolare a unor bacterii din mediul lor natural. În cursul metabolismului aerob, ~50% din C substratului este convertit în C celular. Deoarece 50% din greutatea uscată a celulelor este reprezentată de C, este posibil să se calculeze cantitatea de C necesară în mediu pentru a obține o anumită creștere în greutatea celulară. Dacă, spre exemplu, este necesară obținerea a 100 g greutate uscată de celule, în cazul unui metabolism aerob, cantitatea de C necesar în mediu este de 100 g ($100/2 \times \times 100/50 = 100$ g). În cazul în care C este furnizat sub formă de hexoză, cantitatea de hexoză necesară este de 250 g/l de mediu ($100 \times 180/72 = = 250$ g/l). În practica de laborator se folosesc comun carbohidrați și, în special, glucoză ca sursă de energie, fapt care arată eficacitatea deosebită a acestui grup de substanțe de a fi utilizate ca sursă de energie (Guirard, 1962). Cu toate acestea, practic, toți compușii naturali și foarte mulți dintre compușii realizați prin sinteză chimică pot fi folosiți ca sursă de C și de energie de unul sau de mai multe microorganisme. După Stanier (1970), extraordinara varietate a necesităților de C este unul dintre cele mai fascinante aspecte ale fiziologiei microorganismelor.

SURSA DE AZOT

Azotul este necesar în cantități mari deoarece reprezintă ~ 10% din greutatea uscată a celulei bacteriene, în care este încorporat, în general, sub formă redusă, ca grupări $-NH_2$. El este prezent în mod natural

ca N_2 sau în diferite combinații ca NH_3, nitrat, nitrit sau compuși organici. În cazul microorganismelor cu exigențe complexe de creștere, încă necunoscute, acestea pot fi satisfăcute numai de extracte de țesuturi animale sau vegetale. Sursa preferată de N pare să fie NH_3, care este utilizat practic de toate microorganismele. În cazul microorganismelor fixatoare de N_2, acesta este redus inițial la NH_3, înainte de a fi încorporat în produși organici. În mod similar, microorganismele care folosesc nitrații sau cele care utilizează N organic (sub formă de aminoacizi și / sau polipeptide, care servesc și ca sursă adițională de C și energie) îi convertesc inițial la NH_3, formă accesibilă pentru biosinteze.

FACTORII DE CREȘTERE

Încă din anul 1901, Wildiers a observat că levurile nu se pot dezvolta pe medii de cultură sintetice, formate exclusiv din substanțe minerale ca surse de N și C, decît dacă li se adaugă culturi vechi sau omorîte de levuri sau extracte de levuri cultivate pe medii complexe sau pe diverse produse de origine biologică (extracte vegetale, gălbenuș de ou etc.). Mediul sintetic nu satisface, prin urmare, nevoile metabolice ale levurii, în timp ce însămînțarea abundentă, adăugarea de levuri omorîte sau de alte substanțe complexe îl îmbogățesc cu un factor care stimulează creșterea. Substanțele nedefinite prezente în aceste preparate au fost numite ,,factorul bios'' (Eastcott, 1928).

Ulterior, s-a demonstrat că factorul bios este un amestec de vitamine și aminoacizi, ca : mezoinozitol, acid pantotenic, piridoxină, acid nicotinic, biotină, aneurină, β-alanină, L-leucină etc. Cercetările care au urmat au arătat că acest fenomen are un caracter mult mai larg și că unele microorganisme au nevoie nu numai de surse de energie, de C și de N, ci și de anumite substanțe organice oligodinamice, esențiale pentru metabolismul lor, numite *factori de creștere*. Acțiunea acestora fiind asemănătoare aceleia exercitate de vitamine în metabolismul animalelor superioare, au mai fost numite, prin analogie, și *vitamine microbiene*.

După definiția lui Lwoff (1943), factorii de creștere ai unui anumit microorganism sînt acele substanțe pe care microorganismul dat este incapabil să le sintetizeze în cursul metabolismului său și în absența cărora multiplicarea lui este imposibilă. Ei nu sînt numai substanțe indispensabile vieții unor anumite organisme, care nu se pot dezvolta în lipsa lor, ci reprezintă metaboliți esențiali necesari tuturor microorganismelor. La unele microorganisme însă, factorii de creștere sînt de origine endogenă, fiind elaborați prin biosinteză în cursul metabolismului celular, astfel încît prezența lor în mediu ca substanțe preformate nu este necesară și, ca atare, exigențele bacteriene în această privință nu sînt evidente. În schimb, microorganismele care nu au capacitatea de a sintetiza unul sau mai mulți dintre acești metaboliți esențiali nu pot trăi decît dacă mediul lor este suplimentat cu factorul sau factorii de creștere pentru a căror sinteză facultățile lor metabolice sînt deficitare.

În funcție de natura lor chimică, factorii de creștere pot fi grupați în trei categorii : 1) *aminoacizi* necesari pentru sinteza proteinelor ; 2) *purine*

și pirimidine utilizate pentru sinteza ARN, ADN și a unor coenzime; 3) *vitamine* care funcționează ca grupări prostetice ale unor enzime, ale unor proteine-purtător sau cu funcție de coenzime. Unele bacterii au nevoie de factori de creștere mai puțin obișnuiți. Spre exemplu, micoplasmele au nevoie de prezența în mediu a colesterolului, pe care îl încorporează în structura membranei plasmatice, iar bacteriile din genul *Haemophilus* au nevoie de porfirine, care sînt furnizate în mediu prin adăugare de sînge.

În raport cu celelalte categorii de nutrienți, care servesc pentru formarea constituenților celulari, factorii de creștere sînt necesari în cantități mici, deoarece cei mai mulți îndeplinesc funcții specifice în biosinteze. Astfel, aminoacizii naturali intră în compoziția proteinelor, în așa fel încît nevoia pentru un anumit aminoacid specific, pe care microorganismul nu-l poate sintetiza, nu este mare. Substanțele din categoria vitaminelor sînt necesare în cantități și mai mici (de ordinul a cîteva părți per milion, raportate la greutatea uscată a celulelor), deoarece ele funcționează ca precursori ai unor coenzime cu rol catalitic (tabelul nr. 6).

Tabelul nr. 6

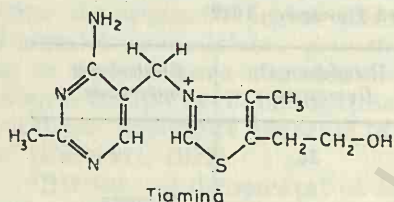
Concentrația unor vitamine hidrosolubile în celulele bacteriene, exprimată în ppm/greutate uscată*) (după Thompson, 1942)

Vitamina	*Aerobacter aerogenes*	*Pseudomonas fluorescens*	*Clostridium butyricum*
Tiamină	11	26	9
Biotină	4	7	Necesar pentru creștere
Riboflavină	44	67	55
Acid pantotenic	140	91	93
Acid folic	14	9	3
Acid nicotinic	240	210	250
Piridoxină	7	6	6

*) În celulele microorganismelor, vitaminele sînt prezente sub formă de coenzime. Deoarece măsurarea lor după extracție este dependentă de conversia în vitaminele corespunzătoare, datele sînt exprimate sub această formă.

În unele cazuri, factorul de creștere însuși poate să nu fie absolut esențial pentru creștere. Dacă, spre exemplu, reacția blocată se află într-un stadiu timpuriu al biosintezei factorului de creștere, există posibilitatea ca unii precursori organici care urmează treptei blocate să satisfacă nevoile celulei în nutrienți specifici. Spre exemplu, în cazul tiaminei, unele microorganisme au nevoie de molecula întreagă a vitaminei (alcătuită dintr-un ciclu pirimidinic și un ciclu tiazol, legate printr-o punte metilenică), alte microorganisme numai de porțiunea pirimidină (deoarece pot sintetiza gruparea tiazol), altele numai de porțiunea tiazol (deoarece pot sinte-

tiza pirimidina) şi, în sfîrşit, unele, în prezenţa celor două molecule componente, au capacitatea de a le cupla pentru a forma molecula întreagă. În raport cu nevoia de tiamină, microorganismele se împart în patru categorii : 1) *Bacillus para-alvei* poate sintetiza pirimidină, dar are nevoie de tiazol ; 2) *Brucella* sp. are nevoie de pirimidină şi este capabilă să sintetizeze gruparea tiazol ; 3) *Staphylococcus aureus* are nevoie şi de tiazol şi de pirimidină, dar dispune de sistemul enzimatic necesar pentru sinteza tiaminei pornind de la cei doi compuşi ; 4) *Lactobacillus fermenti*, care este lipsit de echipamentul de sinteză corespunzător, are nevoie de prezenţa tiaminei ca atare (preformată) în mediu. Compusul activ utilizat ca un component esenţial este coenzima tiaminpirofosfat (esterul pirofosforic al tiaminei) formată prin fosforilarea tiaminei în prezenţa ATP şi a ionilor de Mg (fig. 2). Ca urmare, deşi pentru fiecare dintre microorganismele descrise, necesarul real de factori de creştere este diferit, în fiecare caz, în parte, ele au nevoie pentru desfăşurarea metabolismului lor de molecula întreagă de tiamină. În cazul în care acest compus este adăugat în mediu, toate tipurile descrise îl pot folosi.



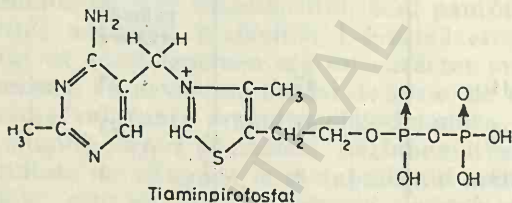


Fig. 2. — Structura chimică a tiaminei şi a tiaminpirofosfatului.

Piridoxina (vitamina B_6) acţionează ca factor de creştere, ca atare, sau sub forma compuşilor înrudiţi, *piridoxal* şi *piridoxamină* (cu valoare echivalentă pentru levuri şi fungii filamentoşi). La bacterii însă, piridoxalul şi piridoxamina sînt active ca factor de creştere la concentraţii de o mie de ori mai mici decît cele ale piridoxinei. Activitatea lor este legată de coenzima piridoxal-5-fosfat, care are o mare importanţă în metabolismul aminoacizilor şi al altor substanţe.

Acidul pantotenic are o comportare similară tiaminei ca factor de creştere. El are doi precursori : β-alanina şi acidul pantoic. Unele organisme sintetizează numai unul dintre precursori, β-alanina (levuri, *Corynebacterium diphteriae* etc.) sau acidul pantoic (*Acetobacter suboxydans*, streptococul hemolitic etc.), în timp ce altele (*Lactobacillus*) au nevoie de acest factor întreg din cauza incapacităţii de a-l lega pentru a forma factorul de creştere ca atare.

Rolul fiziologic al celorlalţi factori de creştere este prezentat în tabelul nr. 7.

Tabelul nr. 7

Principalii factori de creștere ai microorganismelor și rolul lor în metabolism

Compusul	Microorganismele dependente (exemple)	Concentrația care limitează creșterea (ng/ml)	Rolul în metabolism
Acid folic	*Lactobacillus casei* *Streptococcus faecalis*	0—0,15 0—0,8	Ca acid tetrahidrofolic, coenzimă implicată în transferul unităților C_1
Acid lipoic (ditio-octanic)	*Streptococcus lactis* *Tetrahymena geleii*	0—0,03 0—0,3	Grupare prostetică a complexului piruvat dehidrogenazei
Acid nicotinic	*Lactobacillus arabinosus* *Proteus vulgaris* *Shigella paradysenteriae*	0—40 0—20 0—25	Precursor al NAD^+ și $NADP^+$
Acid pantotenic	*Lactobacillus casei* *Proteus morganii*	0—20 0— 0,5	Precursor al coenzimei A; grup prostetic al unor proteine-purtător; rol în oxidarea cetoacizilor și în metabolismul acizilor grași
Acid para-aminobenzoic	*Acetobacter suboxydans* *Clostridium acetobutylicum*	0—1,0 0—1,0	Precursor al acidului tetrahidrofolic, coenzimă implicată în transferul unităților C_1
Biotină	*Lactobacillus arabinosus* *Rhizobium trifolii*	0—0,8 0—0,2	Grup prostetic al enzimelor care catalizează reacții de carboxilare; rol în fixarea CO_2 și transferul grupării carboxil
Ciancobalamină (vitamina B_{12})	*Lactobacillus lactis* *Lactobacillus leishmanii*	0—0,026 0—0,025	Coenzimă implicată în reacții de rearanjare moleculară
Piridoxină (vitamina B_6)	*Lactobacillus casei* *Streptococcus faecalis*	0—0,7 0—0,4	Rol în metabolismul aminoacizilor (transaminare, dezaminare, decarboxilare); ca piridoxalfosfat, coenzimă pentru transaminaze și aminoacid decarboxilaze
Riboflavină (vitamina B_2)	*Lactobacillus casei* *Clostridium tetani*	0— 25 0—100	Precursor al FMN și FAD; rol în transportul electronilor și în unele dehidrogenări
Tiamină (vitamina B_1)	*Lactobacillus fermenti* *Staphylococcus aureus*	0—5 0—0,5	Ca tiaminpirofosfat, grupare prostetică a decarboxilazelor, transaldolazelor și transcetolazelor
Vitamina K	*Mycobacterium tuberculosis* *Fusiformis nigrescens*	0—1 000 0—1 000	Precursor al menachinonei, care funcționează ca transportor de electroni

Aminoacizii sînt necesari în cantități comparativ mai mari pentru a asigura creșterea microorganismelor, deoarece sînt folosiți în biosinteza proteinelor. Spre deosebire de vitamine, utilizarea lor în metabolism nu are caracter de specificitate, deoarece sînt folosiți pentru formarea unei mari varietăți de constituenți celulari proteici. În funcție de natura bacteriilor și de funcțiile pierdute în cursul evoluției, nevoile în aminoacizi variază între 0 și 18 aminoacizi, în aproape toate combinațiile posibile. Spre exemplu, bacteria *Leuconostoc mesenteroides* are nevoie de 17 aminoacizi. În unele cazuri, prezența unui anumit aminoacid în mediu poate crea o nevoie artificială pentru alt aminoacid, reflectînd competiția dintre doi aminoacizi diferiți.

Bacteriile care au nevoie de anumiți aminoacizi ca factori de creștere utilizează frecvent și polipeptidele care îi conțin.

Factorii stimulatori de creștere sînt substanțe care, fără a fi esențiale pentru supraviețuirea și multiplicarea unor microorganisme, le accelerează sau ameliorează dezvoltarea atunci cînd sînt adăugate în mediu (de exemplu, biotina pentru *S. cerevisiae)*. Efectul stimulator al îmbogățirii mediului de cultură cu acești factori este datorat faptului că deși microorganismele îi sintetizează, biosinteza lor se face într-un ritm prea lent și în cantități care nu pot satisface integral exigențele unei dezvoltări abundente a culturii.

Semnificația biologică a factorilor de creștere. După concepția lui Lwoff (1944), factorii de creștere nu sînt necesari numai pentru viața organismelor care manifestă această nevoie, ci sînt constituenți ai tuturor organismelor vii: sînt metaboliți esențiali. Dacă un microorganism este incapabil să sintetizeze un anumit metabolit esențial, acesta trebuie furnizat ca atare în mediul de cultură și astfel nevoia pentru un anumit factor de creștere devine evidentă. Nevoia de factori de creștere ar reflecta procesul de evoluție regresivă a unor microorganisme care au suferit o degradare fiziologică legată de scăderea potențialului celular de biosinteză.

În felul acesta, după Lwoff, evoluția ființelor vii spre forme din ce în ce mai complexe și din ce în ce mai bine adaptate la un anumit mediu natural s-ar însoți obligatoriu de pierderea unor funcții și în special a celor de tip biosintetic. Această degradare poate fi *calitativă*, reprezentînd pierderea totală a unei funcții, ca urmare a instalării unei incapacități de sinteză, în care caz ea se manifestă prin nevoia absolută pentru un anumit factor de creștere, fără de care viața celulei nu mai este posibilă. Ea poate fi uneori numai *cantitativă*, ca o consecință a unei diminuări a activității funcționale, consecutivă scăderii unei capacități de sinteză. În acest caz, dacă se urmărește o dezvoltare optimă a populației bacteriene devine necesară suplimentarea mediului de cultură, cu factorul stimulator corespunzător. În cazurile în care nevoile specifice de factori de creștere sînt cunoscute precis, ei pot fi incluși ca atare în compoziția mediilor de cultură și microorganismele pot fi cultivate pe medii sintetice. Întrucît însă, de cele mai multe ori, aceste necesități nu sînt cunoscute, în mod obișnuit se adaugă în compoziția mediilor de cultură, ca sursă de factori de creștere, substanțe organice complexe și ieftine cum sînt extractele de drojdie și de carne, serul sanguin, sîngele etc.

Dozarea biologică a vitaminelor. Nevoia de factori de creştere a unor organisme este atît de specifică, încît atunci cînd un microorganism auxotrof este cultivat într-un mediu în care creşterea este limitată de un factor esenţial, multiplicarea lui şi creşterea totală este proporţională cu concentraţia acestui factor în mediu. Asemenea microorganisme sînt folosite în practică pentru aprecierea cantităţii de vitamină dintr-un mediu, care poate fi dozată în raport cu o curbă de referinţă stabilită pentru factorul

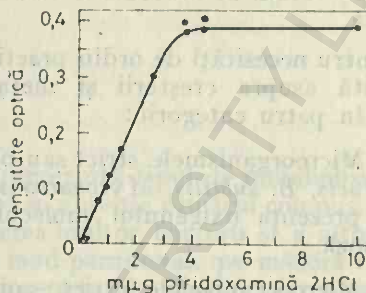


Fig. 3. — Curba de creştere a unei tulpini de *Streptococcus faecalis* (ATTC 8043), în medii de cultură care conţin cantităţi crescînde de piridoxamină (după Guirard şi Smell, 1962).

considerat şi pentru tulpina microbiană respectivă. Însămînţate într-un mediu care conţine toate substanţele necesare pentru creştere, cu excepţia vitaminei de dozat, aceste microorganisme nu se dezvoltă. Adăugarea vitaminei în mediu produce o stimulare a creşterii şi a activităţii metabolice, în raport direct cu cantitatea de vitamină adăugată (fig. 3). Astfel, de exemplu, *Lactobacillus helveticus*, care nu creşte deloc în medii fără riboflavină, se dezvoltă abundent dacă se adaugă 0,0001 mg/ml riboflavină la un mediu care conţine toate celelalte substanţe necesare.

Tehnica este aplicată pentru dozarea aminoacizilor, a tiaminei, utilizînd ca microorganisme-test *Streptococcus salivarius* sau *Saccharomyces cerevisiae*, a riboflavinei şi acidului pantotenic (cu *Lactobacillus casei*), a acidului nicotinic (cu *Lactobacillus arabinosus* sau *Proteus OX19)*, a vitaminei B_{12}, biotinei, piridoxinei etc. Dozările biologice sînt stereospecifice, simple şi economice şi considerate de unii autori (Senez, 1968) mult mai sensibile decît cele mai bune metode chimice. Spre exemplu, utilizarea unei tulpini de *L. leichmanii* auxotrofă pentru vitamina B_{12} permite dozarea acesteia cu o precizie şi reproductibilitate egală cu 1 nanogram (10^{-12} g/ml).

OXIGENUL

Constituent universal al celulelor vii, oxigenul este furnizat microorganismelor, în primul rînd, de diferiţi nutrienţi şi de apa din constituţia mediilor de cultură. Din cauza solubilităţii sale scăzute, oxigenul aflat în soluţie este utilizat foarte repede de bacteriile aerobe, chiar în cazul unor populaţii puţin numeroase. De aceea, frecvent, densitatea atinsă de o cultură este adesea limitată de rata de difuzie a O_2 prin interfaţa aer — apă, chiar cînd culturile sînt bine aerate, şi, destul de des, în cazul culturilor foarte bogate, ultima parte a dezvoltării lor are loc în condiţii de relativă

anaerobioză. În culturile aerate, prin simpla rotație a flacoanelor, creșterea unor bacterii aerobe este adesea limitată la ~1—2 mg greutate uscată/ml. Creșterea mai abundentă necesită tehnici speciale, care măresc aria interfeței lichid — aer, ca, de exemplu, barbotarea rapidă cu aer, printr-un filtru poros sau prin recirculare a culturii. Dificultatea de a aera corespunzător culturile bacteriene abundente limitează obținerea acestora pe scară industrială — ca biomasă — comparativ cu levurile care au un raport suprafață / volum de ~ 100 de ori mai mic și o activitate respiratorie mai lentă.

Pentru necesități de ordin practic, pe baza efectului pe care oxigenul îl exercită asupra creșterii și metabolismului, microorganismele pot fi grupate în patru categorii:

1) Microorganismele strict sau obligatoriu aerobe (de exemplu, *Bacillus anthracis, B. subtilis, Mycobacterium tuberculosis)*, care au nevoie absolută de prezența oxigenului molecular și sînt incapabile să trăiască în anaerobioză.

2) Microorganismele strict sau obligatoriu anaerobe (de exemplu, *Clostridium tetani, C. botulinum, Welchia perfringens* etc.), care nu se pot dezvolta în prezența oxigenului molecular și, ca urmare, pot fi cultivate numai în medii sărăcite în O_2, deoarece chiar la presiuni joase, de ordinul a 10^{-5} atm, pot avea efect inhibitor. În practică, înglobarea în mediu a unui compus sulfhidrilic ca, de exemplu, tioglicolatul de sodiu ($HSCH_2COONa$) 0,1 %, favorizează creșterea bacteriilor anaerobe, prin reducerea O_2 și scăderea sensibilității față de prezența sa în mediu. Alte procedee ca, de exemplu, adăugarea unui strat de ulei de parafină, utilizarea de agar semisolid (0,2—0,3 %), pentru a diminua difuzia O_2, sau cultivarea în recipiente (anaerobiostate) din care O_2 a fost îndepărtat sau înlocuit cu un amestec controlat de alte gaze, urmăresc același scop.

3) Microorganismele microaerofile (de exemplu, *Spirochaetales, Thiobacteriales* etc.) cresc cel mai bine la presiuni de O_2 mai mici (~ 0,2 atm) decît în aerul atmosferic. Această particularitate reflectă prezența unor enzime care sînt inactivate în condiții de oxidare puternică și pot fi menținute în stare funcțională numai la presiuni joase de O_2.

4) Microorganismele anaerobe, facultativ aerobe *(E. coli, Staphylococcus, Streptococcus* etc.) au capacitatea de a se dezvolta deopotrivă în prezența sau în absența O_2. Unele dintre ele (de exemplu, bacteriile lactice) desfășoară în esență un metabolism de tip fermentativ, chiar în prezența aerului, fără a fi sensibile la O_2. Altele, cum sînt levurile, *E. coli* și *Enterobacteriaceae*-le, în general, sînt capabile să-și orienteze metabolismul spre respirație sau spre fermentație, în funcție de condițiile de mediu, respectiv de disponibilitățile de O_2. În esență, nevoia de O_2 reflectă mecanismul molecular prin care microorganismele își satisfac nevoile energetice.

AUTOTROFIA

(Pl. 2)

În concepţia clasică, autotrofia reprezintă tipul de metabolism caracteristic organismelor capabile să crească în absenţa oricărui compus organic, necesar în mod obişnuit pentru creşterea multor bacterii şi a altor microorganisme. În ultimele trei decenii, în mod paradoxal, pe măsură ce cunoştinţele referitoare la biochimia şi interrelaţiile dintre microorganismele considerate iniţial ca fiind neîndoielnic autotrofe sau heterotrofe au fost aprofundate, trăsăturile fundamentale ale acestui concept au devenit din ce în ce mai deformate, mai vagi şi mai confuze. După Whittenbury şi Kelly (1977), conceptul tradiţional asupra autotrofiei a durat mai mult decît a fost util. Ca urmare, paralel cu încercarea de a-l redefini, au apărut o serie de termeni noi, au fost reformulaţi cei vechi, dar coexistenţa cadrului nou, redefinit, cu vechile concepţii a contribuit în mod deosebit la întreţinerea acestor neclarităţi. Ţinînd seama de această situaţie, vom prezenta atît conceptele devenite tradiţionale, cît şi cadrul nou definit.

Clasic, microorganismele autotrofe utilizează CO_2 ca sursă unică sau majoră de carbon celular şi N sub formă de NH_3, nitrat sau chiar N molecular, diferite săruri minerale şi apa, de la care îşi construiesc numeroasele substanţe organice caracteristice organismelor vii. În timp ce toate microorganismele autotrofe utilizează aceeaşi sursă de C — CO_2, ele se deosebesc, în raport cu natura sursei de energie care asigură creşterea, putînd fi diferenţiate în : — *fotoautotrofe*, care pot obţine toată energia necesară pentru creştere de la lumină, oxidînd compuşi anorganici reduşi ai sulfului sau S^0 şi — *chimioautotrofe*, care îşi obţin energia necesară din oxidarea unor compuşi anorganici reduşi ca NH_3, nitriţi, compuşi ai S, Fe sau H_2.

Sub raportul capacităţii lor de biosinteză, autotrofele pot fi considerate ca microorganismele cele mai „complete", deoarece posedă sistemele enzimatice cele mai complexe, care asigură producerea tuturor componenţilor celulari de la CO_2 pe seama oxidării unor substraturi anorganice. În acest cadru, au fost descrise următoarele categorii de microorganisme autotrofe :

— *Microorganismele autotrofe obligate,* care fixează CO_2 ca principală sursă de C, pe calea ciclului Benson—Calvin (calea ribulozodifosfatului), utilizînd o substanţă anorganică redusă ca sursă de energie, sau, dacă sînt fototrofe, ca donator de electroni. Ele sînt de două tipuri : 1) *microorganismele chemolitotrofe obligate* obţin toată energia necesară pentru

creştere şi pentru asimilarea C prin oxidarea specifică (în absenţa luminii) a unor compuşi anorganici ai S, ai ionilor NH_4^+, nitrit şi fier feros sau a H molecular; 2) *microorganismele fotolitotrofe obligate* utilizează energia luminoasă, asociată cu oxidarea compuşilor reduşi ai S sau H_2.

— *Microorganismele autotrofe facultative* au o mult mai mare adaptabilitate metabolică, incluzînd specii (*Thiobacillus novelus, Hydrogenomonas* etc.) ale căror particularităţi fiziologice merg de la capacitatea de a se dezvolta autotrof pînă la cea de creştere heterotrofă. Chemolitotrofele facultative pot creşte fie autotrof (în medii cu săruri minerale, utilizînd substanţe anorganice ca sursă de C şi energie), fie heterotrof, folosind substanţe organice.

Orientări noi asupra conceptului de autotrofie. După cum am arătat, definiţia autotrofelor la început a fost precisă şi legată numai de metabolismul carbonului, caracterizînd organisme care folosesc energia obţinută prin oxidarea unor donatori anorganici de electroni pentru a fixa CO_2, ca primă şi indispensabilă sursă de C, pe calea ribulozodifosfatului (ciclul Benson—Calvin). Schlägel (1975), cel dintîi, a considerat definiţia autotrofiei legată de utilizarea CO_2 ca sursă majoră obligatorie de C ca depăşită. Definitoriu pentru autotrofe, după el, este faptul că un organism *este capabil* să sintetizeze substanţele celulare de la CO_2, ca sursă principală de C, deoarece faptul că unele autotrofe sînt facultativ heterotrofe şi pot creşte ocazional şi pe substanţe organice este de importanţă minoră. Pe de altă parte, numeroase fapte de observaţie au demonstrat că cele mai multe microorganisme „autotrofe" nu se încadrează în conceptul riguros clasic stabilit şi au dus la mai multe încercări de redefinire a conceptului de autotrofie, asupra căruia — în prezent — nu mai există un acord unanim.

Whittenbury şi Kelly (1977) citează, între altele, următoarele argumente:

1) Microorganismele autotrofe nu prezintă nici un mecanism comun de oxidare a compuşilor anorganici, ceea ce demonstrează caracterul neunitar al grupului; diferitele substraturi (NO_2^-, NH_4^+, compuşii reduşi ai S, H_2, Fe^{2+}) sînt oxidate de enzime diferite, pe căi diferite.

2) Cele mai multe bacterii autotrofe nu sînt inhibate de anumite substanţe organice din mediu sau nu sînt singurele organisme inhibate.

3) Numeroase microorganisme considerate convenţional ca heterotrofe oxidează anumite substanţe anorganice, ceea ce demonstrează că oxidarea compuşilor anorganici reduşi nu este o proprietate limitată la autotrofe şi nici un caracter-cheie obligatoriu pentru autotrofie. Spre exemplu, *Pseudomonas* sp. oxidează tiosulfatul şi tetrationatul, *Desulfovibrio* oxidează H_2, iar actinomicetele NH_4^+ la nitrit.

4) Există bacterii care nu cresc în absenţa luminii sau a unor surse anorganice de energie. Ele trebuie descrise ca fototrofe obligate sau chemolitotrofe obligate. Nici una nu este însă autotrofă obligată.

5) Toate microorganismele presupuse strict autotrofe, testate pînă în prezent, asimilează şi metabolizează compuşi organici furnizaţi de la exterior. Dealtfel, existenţa unor microorganisme autotrofe „obligate" ar fi în prezent un anacronism din punctul de vedere ecologic şi evoluţionist. Depen-

dența exclusivă de CO_2 pentru tot carbonul celular ar avea puțin sens în raport cu condițiile actuale din natură (Rittenberg, 1972), astfel încît, practic, toate autotrofele pot utiliza compuși organici simpli (cum este acetatul), ca sursă secundară de C.

6) Au fost izolate microorganisme facultativ chemolitotrofe capabile să crească pe medii organice, ca heterotrofe, mixotrofe sau chemolitotrofe heterotrofe, utilizînd substanțele anorganice ca sursă de energie pentru a face asimilarea unor substanțe organice pentru creștere.

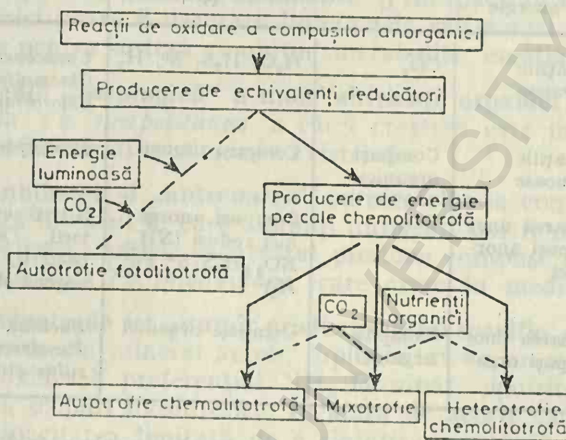


Fig. 4. — Relațiile dintre oxidările substanțelor anorganice și metabolismul fotolitotrof și chemolitotrof (după Kelly, 1981).

După Kelly (1981), această fiziologie „amestecată" este mult mai răspîndită între microorganisme decît se crede, ceea ce demonstrează independența chemolitotrofiei în raport cu autotrofia și existența unei flexibilități metabolice cu mare importanță practică pentru supraviețuirea microorganismelor, în condițiile de competiție din mediile naturale. Pe plan teoretic, existența acestor fenomene, ilustrate schematic în fig. 4, demonstrează, în primul rînd, necesitatea evitării definirii dogmatice a tipurilor fiziologice de microorganisme (Whittenbury și Kelly, 1977) și existența unor zone de „suprapuneri" în care organisme cu fiziologie aparent fundamental diferită se comportă similar (Kelly, 1981). În același timp, aceste date demonstrează că principalele categorii de autotrofe descrise în literatura de specialitate nu acoperă toate categoriile nutriționale care pot fi considerate ca autotrofe. Din datele prezentate rezultă că este preferabil să se mențină o separare netă între metabolismul energetic și cel al carbonului, deoarece este evident că producerea de energie de la un substrat anorganic nu trebuie cuplată obligatoriu exclusiv cu autotrofia.

În felul acesta, există posibilitatea clasificării fiziologice precise, în funcție de sursa de energie (litotrof sau organotrof) și de tipul de nutriție cu C (autotrof sau heterotrof). Astfel, în timp ce termenul clasic de *autotrof* poate implica sau nu utilizarea unui donator anorganic de electroni, în funcție de definiția acceptată pentru autotrofie, termenul de *chemolitoauto-*

trof este precis și înseamnă organism care fixează CO_2, utilizînd energia eliberată prin reacții chimice din oxidarea unor donatori anorganici de electroni (tabelul nr. 8).

Tabelul nr. 8

Principalele tipuri de metabolism bacterian, în funcție de natura sursei de energie, sursei de C și donatorul de H

Tipul de metabolism	Sursa de energie	Sursa de C	Donatorul de H	Exemple
Fotolito-autotrof	Radiațiile luminoase	CO_2	H_2O, H_2S, S^0, H_2	*Cyanobacteria* *Chromatiaceae* *Chlorobiaceae*
Fotoorgano-heterotrofe	Radiațiile luminoase	Compuși organici	Compuși organici	*Rhodospirillaceae*
Chemolito-autotrof	Oxidarea unor compuși anorganici	CO_2	Compuși anorganici reduși (NH_3, NO_2^-, H_2S, S^0, Fe^{2+}, H_2)	Nitritbacterii, nitratbacterii, *Thiobacillus*, ferobacterii, bacterii metanogene și acetogene
Chemoorgano-heterotrof	Oxidarea unor compuși organici	Compuși organici	Compuși organici	*Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* etc.

Pe baza acestor date, tendința modernă exprimată de Whittenbury și Kelly (1971), precum și de Kelly (1981) este de a lărgi cadrul conceptului clasic de autotrofie, prea restrictiv în raport cu realitățile existente în natură, pentru a cuprinde toate microorganismele capabile să obțină cea mai mare parte din C utilizat pentru biosinteza constituenților celulari de la CO_2 sau din metabolizarea oricărui alt compus de tipul C_1. În acest context, conceptul de autotrofie include: 1) organismele considerate ca autotrofe și în concepția clasică, care asimilează CO_2 pe calea ciclului Calvin: 2) organismele care folosesc alți compuși de tip C_1 și calea ribulozomonofosfatului, calea serinei sau alte căi specifice.

CAUZELE AUTOTROFIEI OBLIGATE

Nu există o explicație valabilă pentru toate cazurile de autotrofie. Mai mulți factori, acționînd separat sau în combinație, pot explica autotrofia unui organism sau a unui grup de organisme. Între aceștia, mai importanți sînt următorii :

1) **Permeabilitatea limitată față de nutrienții organici.** Deși reală, această proprietate nu explică toate cazurile de autotrofie. Experimental, s-a demonstrat că *Thiobacillus thiooxidans*, adaptat să trăiască într-un mediu toxic, împiedică pătrunderea compușilor organici nocivi în celulă prin proprietatea de permeabilitate selectivă (Umbreit, 1962), comportîndu-se ca un „submarin biologic", izolat etanș de produșii dăunători din mediu.

În schimb, alte bacterii autotrofe (*Th. denitrificans*) sînt permeabile pentru anumite substanțe organice (glicerol), deși nu le folosesc în metabolism.

2) **Incapacitatea de a obține suficientă energie de la substratul heterotrof.** Formarea de ATP de la substraturile organice pătrunse în celulă este imposibilă sau deficitară la autotrofe, fie datorită incapacității de a oxida acești compuși, fie datorită lipsei sistemelor producătoare de energie cunoscute la heterotrofe.

3) **Prezența unei „leziuni metabolice".** Incapacitatea de a crește pe nutrienți organici poate fi datorată lipsei uneia sau a mai multor enzime-cheie, necesare pentru sinteza anumitor metaboliți esențiali.

4) **Influența „patologică" a unor nutrienți organici exogeni** a fost demonstrată la *Th. neapolitanus*, a cărei creștere este inhibată de mici cantități de fenilalanină, metionină și cisteină.

5) **Autoinhibarea și „antrenarea" autotrofelor** la creștere heterotrofă a fost observată în cazul în care anumiți nutrienți pot fi metabolizați, dar nu permit creșterea. Astfel, aspartatul produce compuși toxici cînd este prezent în culturile de *Th. thiooxidans*, care cresc în medii cu S și CO_2.

6) **Dependența de un anumit produs esențial specific.** În condiții heterotrofe, într-un mediu mineral aerob, suplimentat cu un substrat organic, *Nitrosomonas* oxidează preferențial NH_3 la nitrit, epuizînd sursa de N necesară pentru scopuri biosintetice. În afară de aceste cauze au mai fost incriminate, capacitatea limitată de a sintetiza compușii necesari pentru creștere din alte surse, diferite de CO_2, blocarea biochimică a creșterii în prezența unui exces de nutrienți organici, inhibarea creșterii de către anumiți produși ai metabolismului compușilor organici sau dependența de un anumit intermediar anorganic al procesului respirator în chemotrofie sau fototrofie, pentru anumite reacții specifice în celulă (Kelly, 1969).

MICROORGANISMELE CHEMOLITOAUTOTROFE

Bacteriile chemolitoautotrofe au două particularități de metabolism definitorii și anume: 1) capacitatea de a obține energie (ATP) și putere reducătoare din oxidarea unor compuși anorganici (H_2, CO, NH_3, NO_2^-, Fe^{2+}, S^0, $S_2O_3^{2-}$ etc.) și 2) de a utiliza CO_2 ca sursă unică sau principală de C, pe care îl reduc la aldehidă 3-fosfoglicerică (fixarea reductivă a CO_2) pentru a participa la metabolismul celular (ciclul Calvin—Barsham).

Unele sînt chemolitoautotrofe obligate (bacteriile care oxidează NH_3 și NO_2^-), altele sînt facultative (hidrogenbacteriile), deoarece pot crește și chemoorganotrof utilizînd carbohidrați sau acizi organici. Capacitatea de a oxida compuși anorganici reduși nu este limitată la chemolitotrofe. Unele heterotrofe posedă enzimele necesare pentru oxidarea H_2, dar nu se pot dezvolta pe medii complet anorganice datorită incapacității de a utiliza CO_2 ca sursă unică de C, din lipsa enzimelor ciclului Calvin. De asemenea, unele bacterii heterotrofe pot oxida cu mai mică eficiență compușii reduși

ai N (NH_3, NO_2^-), ceea ce demonstrează că utilizarea acestora nu este o particularitate exclusivă a chemolitotrofelor.

În raport cu heterotrofele, microorganismele chemolitotrofe prezintă o serie de dezavantaje legate de metabolismul energetic. Deşi realizează reacţii de oxidare care asigură o conversie energetică globală cu o eficienţă considerabilă, ele cresc slab şi produc mai puţin ATP, datorită randamentului energetic molar relativ scăzut al substraturilor pe care le folosesc (Kelly, 1978). În acelaşi timp, ele sînt handicapate de faptul că fixarea reductivă a CO_2, principala sursă de carbon celular, necesită putere reducătoare pentru a aduce C din CO_2 la nivelul de oxidare caracteristic glucidelor. Aceasta explică de ce chemolitotrofele — cu excepţia celor care oxidează hidrogenul — consumă 80 % din bugetul lor energetic total pentru conversia CO_2 în constituenţi celulari.

Diferitele grupuri fiziologice de microorganisme chemolitotrofe utilizează ca surse de energie numai o gamă limitată de substanţe anorganice, în raport cu natura cărora sînt, de regulă, denumite şi clasificate (tabelul nr. 9).

Tabelul nr. 9

Exemple de bacterii chemolitoautotrofe care folosesc pentru creştere donatori anorganici de electroni (după Schlägel şi Jannasch, 1981)

Grupul fiziologic	Specia tip	Procesul metabolic	Donatorul de electroni	Acceptorul de electroni	Sursa de carbon	Produsul
Bacteriile care oxidează hidrogenul	*Alcaligenes eutrophus*	Oxidarea hidrogenului	H_2	O_2	CO_2	H_2O
Bacteriile care oxidează monooxidul de carbon	*Pseudomonas carboxydovorans*	Oxidarea monooxidului de carbon	CO	O_2	CO_2	CO_2
Bacteriile care oxidează amoniacul	*Nitrosomonas europaea*	Oxidarea amoniacului	NH_4^+	O_2	CO_2	NO_2^-
Bacteriile care oxidează nitriţii	*Nitrobacter winogradskyi*	Oxidarea nitriţilor	NO_2^-	O_2	CO_2	NO_3^-
Bacteriile care oxidează sulful	*Thiobacillus thiooxidans*	Oxidarea sulfului	S^0 $S_2O_3^{2-}$	O_2	CO_2	SO_4^{2-}
Bacteriile care oxidează fierul	*Thiobacillus ferrooxidans*	Oxidarea fierului	Fe^{2+}	O_2	CO_2	Fe^{3+}
Bacteriile metanogene	*Methanobacterium thermoautotrophicum*	Metanogeneză	H_2	CO_2	CO_2	CH_4
Bacteriile acetogene	*Acetobacterium woodii*	Acetogeneză	H_2	CO_2	CO_2	CH_3-COOH

MIXOTROFIA

Este capacitatea microorganismelor chemolitotrofe facultative de a combina utilizarea surselor de energie şi/sau de C autotrofe, cu folosirea substraturilor organice. Termenul de mixotrofie a fost introdus de Pfeffer (1897) pentru a descrie tipul de metabolism în care compuşii organici sînt fie necesari, fie stimulatori pentru creşterea anumitor plante, iar Pringsheim (1967) l-a utilizat pentru a caracteriza bacteriile (de exemplu, *Beggiatoa)* a căror creştere autotrofă este mult stimulată de prezenţa unor compuşi organici specifici.

În accepţiunea sa actuală, mixotrofia implică producerea concomitentă de energie, prin mecanisme alternative, chemolitotrofe şi chemoorganotrofe sau utilizarea concomitentă de mecanisme autotrofe şi heterotrofe (Stukas şi Cicco, 1970; Rittenberg, 1972). Cercetările experimentale au demonstrat că semnificaţia biologică a mixotrofiei este diferită în funcţie de natura microorganismelor şi a substanţelor folosite. Astfel, la *Thiobacillus intermedius*, rata de creştere şi producerea de masă celulară sînt mai mari în condiţii de mixotrofie (mediu cu tiosulfat şi extract de drojdii) decît în condiţii autotrofe sau heterotrofe, cu concentraţii echivalente de substrat (London şi Rittenberg, 1968). Tiosulfatul şi extractul de drojdie contribuie la producerea de energie, dar aproape tot C celular derivă din extract. La *Th. novellus* însă, nutriţia mixotrofă (mediu cu tiosulfat şi glucoză) nu prezintă nici un avantaj, ba chiar este stînjenitoare, diminuînd atît rata de utilizare a glucozei (prin scăderea concentraţiei enzimelor care o folosesc), cît şi rata de creştere, deşi pînă la urmă glucoza este complet utilizată şi densitatea celulelor ajunge, final, aceeaşi ca în mediul cu glucoză (Perez şi Martin, 1979).

Experimental s-a demonstrat că deşi nutrienţii mixotrofi nu au efect beneficial cînd sînt în exces, pot oferi un avantaj deosebit în condiţii de limitare nutriţională. Întrucît în natură aceste condiţii se întîlnesc foarte frecvent, microorganismele mixotrofe au un avantaj selectiv evident faţă de heterotrofe şi de autotrofe, a căror creştere este limitată de cantităţile insuficiente de substanţe organice, respectiv anorganice. Datorită acestui fapt, este probabil că mixotrofia reprezintă modul de existenţă principal al microorganismelor chemolitotrofe facultative în natură.

SINTROFIA

Studiul exigenţelor nutritive ale bacteriei *Haemophilus influenzae* a pus în evidenţă un fenomen general: microorganismele capabile să-şi sintetizeze constituenţii celulari de la compuşi simpli din mediu excretă adesea mici cantităţi de vitamine, aminoacizi sau alţi factori de creştere, în afara celulei lor, unde pot fi folosiţi de alte organisme auxotrofe pentru substanţele respective. Acest fenomen permite dezvoltarea pe medii de cultură solide, în jurul coloniilor „excretoare" de substanţe organice, a unor colonii „satelite" formate din microorganisme mai pretenţioase (auxotrofe), care găsesc astfel substanţele esenţiale pentru creştere. Un mod de manifestare a fenomenului de „satelitism" a fost descris la *H. influenzae*, care pe geloză —

sînge formează colonii mici, punctiforme și translucide. În vecinătatea coloniilor de *Staphylococcus*, care contaminează accidental mediul de cultură, coloniile devin mai mari, mai voluminoase, deoarece stafilococul este capabil să facă sinteza NAD^+ pe care îl excretă în mediu, permițînd astfel bacteriei *H. influenzae* să se dezvolte mult mai abundent decît este posibil în prezența cantităților mici de NAD^+ conținute în sînge.

Sintrofia reprezintă un fenomen de interacțiune nutrițională între două sau mai multe specii de microorganisme, ale căror activități metabolice combinate, cînd se găsesc în același mediu, diferă cantitativ sau calitativ de suma activităților membrilor individuali, cînd sînt cultivați izolat, în același mediu de cultură. Spre exemplu, bacteriile metanogene nu pot utiliza glucoza ca sursă de C și energie, dar pot crește ușor pe seama produșilor finali formați prin degradarea glucozei de către bacteriile anaerobe, capabile să fermenteze acest compus.

„Hrănirea încrucișată" („Cross-feeding") este o variantă a fenomenului de sintrofie, corespunzînd cazurilor de simbioză a două microorganisme auxotrofe care au nevoi nutritive și activități biosintetice complementare. În acest caz, fiecare tip de microorganism depinde de celălalt pentru anumiți nutrienți esențiali, într-un mediu care este deficient pentru fiecare dintre ele în mod separat. Spre exemplu, unele microorganisme pot sintetiza porțiunea pirimidinică a tiaminei, iar altele pot sintetiza porțiunea tiazol. În aceste cazuri, cele două organisme se pot dezvolta *împreună*, într-un mediu care nu conține nici unul din componenții factorului de creștere, deoarece și-l pot furniza reciproc.

În mod similar, nici *H. influenzae* (auxotrof pentru NAD^+), nici *H. canis* (auxotrof pentru hematină) nu se dezvoltă separat pe mediul bulion peptonat, care nu conține aceste substanțe. Dacă însă le însămînțăm simultan, în același flacon cu mediu, fiecare dintre ele excretă factorul de creștere necesar celuilalt și se obține o cultură mixtă.

Hrănirea încrucișată este o formă simplă de reacție simbiotică, de mutualism. În cursul evoluției, interdependențele nutriționale și în special cele de suplinire mutuală a unor nevoi de creștere au dus la o mare varietate de asociații simbiotice care joacă, probabil, un rol esențial în proliferarea microorganismelor în sol, ape și alte medii naturale.

MICROORGANISMELE OLIGOTROFE

După Poindexter (1981), termenul de microorganism oligotrof sau oligocarbofil caracterizează acele microorganisme a căror supraviețuire și dezvoltare ca populații vegetative sînt favorizate de prezența unor concentrații scăzute de substanțe organice în mediu. Încadrarea în această categorie se poate face pe baza capacității microorganismelor respective de a crește în mod evident pe medii de cultură care conțin numai 5—10 mg C/l. Ele se deosebesc astfel de microorganismele *copiotrofe*, a căror creștere este dependentă de o aprovizionare abundentă cu nutrienți (în medie de o sută de ori mai mare decît în habitatele oligotrofe).

După definiția lui Kuznetsov, Dubinina și Lapteva (1979), microorganismele oligotrofe formează în natură un grup ecologic caracteristic mediilor

acvatice, avînd drept particularitate esențială proprietatea de a se dezvolta cu o rată ridicată de creștere în condiții naturale, în prezența unor concentrații minime de substanțe organice. După Lapteva (1979), definitorie pentru bacteriile oligotrofe acvatice ar fi capacitatea de a se dezvolta din momentul izolării lor din natură pe medii cu un conținut minim de substanță organică—apreciat la ~ 1—15 mg C/l—și de a-și menține capacitatea de a crește pe astfel de medii, în cursul recultivărilor ulterioare, deși se pot dezvolta pe medii mai bogate. Yanagita și colab. (1978) au demonstrat că multe bacterii izolate din medii oligotrofe pe medii de cultură sărace pot dobîndi, spontan sau prin adaptare, capacitatea de a se dezvolta pe medii mai bogate.

Clasificarea bacteriilor oligotrofe. Din cauza dificultăților de studiu, bacteriile oligotrofe sînt grupate provizoriu în patru grupuri, create pe baza relațiilor lor cu substanțele organice din mediu :

1) Primul grup cuprinde organisme care se pot dezvolta la prima cultivare în apa sterilizată a bazinului din care provin, dar care nu se dezvoltă în recultivările ulterioare, nici pe medii sărace și nici pe medii-standard bogate. Grupul este format din bacterii cunoscute numai pe baza morfologiei lor, studiată la microscopul electronic.

2) Grupul al doilea este reprezentat de o mare varietate de microorganisme, care nu cresc deloc sau cresc foarte încet dacă sînt trecute din apa de testat pe medii bogate, dar care încep să crească bine pe medii bogate în nutrienți, după recultivarea pe apă sterilă sau pe agar sărac în nutrienți (Mallory și colab., 1977).

3) Grupul al treilea include bacterii cu caractere morfologice și fiziologice particulare, care cresc numai pe medii speciale, uneori fiind nevoie de tehnici particulare de izolare.

4) Grupul al patrulea este format din bacterii insuficient studiate și care nu au fost încă cultivate pe medii artificiale. Multe dintre ele sînt prostecate, ceea ce le conferă un avantaj adaptativ, nu numai pentru fixare, ci și pentru transportul nutrienților în celulă (Caldwell, 1975), (tabelul nr. 10).

Semnificație biologică. Microorganismele oligotrofe acționează în natură ca ultimi utilizatori ai substanțelor organice care rămîn în urma activității mineralizatorilor copiotrofi. Capacitatea lor de a crește la concentrații joase și absența creșterii în medii bogate poate fi explicată pe mai multe căi.

În cazul bacteriilor cu apendice celulare (prostece), prezența acestora are rolul de a crește suprafața celulei și de a servi ca un mecanism adaptativ particular, pentru un transport mărit de substanțe în celulă. Faptul că formarea prostecei și alungirea ei la *Asticcacaulis biprosthecum* și la *Caulobacter crescentus* sînt stimulate de lipsa substanțelor organice din mediu (Staley, 1973; Larson, 1975) pledează în acest sens. Studiile de biochimie au demonstrat că prostecile nu conțin ribosomi, ADN, ARN, NADH-oxidază și dehidrogenaze, dar conțin enzime implicate în transportul substanțelor în celulă și în procesele oxidative (inclusiv citocromi)

Tabelul nr. 10

Caracteristicile generale ale bacteriilor oligotrofe (după Kuznetsov și colab., 1979)

Caracteristicile	Speciile
1. Cresc numai la prima cultivare în apă sterilă. Nu pot fi recultivate	Bacterii cu morfologie neobișnuită (încă neidentificate)
2. Cresc la prima cultivare pe medii sărace. Nu cresc inițial pe medii bogate, dar pot fi recultivate pe medii bogate	Unele specii de *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus saprophyticus*
3. Bacterii izolate sau cultivate numai pe pe medii speciale	Specii de *Hyphomicrobium*, *Caulobacter*, *Microcyclus*, *Leptothrix*, *Ochrobium*, *Metallogenium*, *Pasteuria* etc.
4. Nu pot fi cultivate în laborator. Detectate în bazinele acvatice naturale numai la microscopul electronic	Bacterii prostecate. Foarte multe au vacuole cu gaze

(Jordan, 1974). Aceasta demonstrează că prosteca are o funcție biochimică specializată pentru transportul activ al nutrienților din mediu și pentru reacțiile producătoare de energie, ceea ce conferă un avantaj pentru supraviețuirea bacteriilor în medii foarte diluate.

Inhibarea creșterii bacteriilor oligotrofe în medii bogate în nutrienți pare să fie datorită efectului toxic al produșilor de metabolism și, în special, peroxidului de hidrogen, care se acumulează în mediu și determină liza celulelor. Adăugarea de catalază în mediu permite creșterea abundentă a microorganismelor oligotrofe, chiar în medii de cultură bogate. Bacteriile oligotrofe se dezvoltă bine pe medii bogate în substanțe organice, în asociere cu alte microorganisme producătoare de catalază, situație care, probabil, se întîlnește și în mediile naturale bogate în substanțe organice. Adaptarea bacteriilor oligotrofe la creșterea în medii bogate, după mai multe recultivări pe medii sărace, este probabil rezultatul formării adaptative de catalază.

IMPORTANȚA PRACTICĂ A CUNOAȘTERII EXIGENȚELOR DE NUTRIȚIE

Cunoașterea condițiilor de cultură (compoziția chimică a mediului de cultură, pH, grad de aerare etc.) corespunzătoare exigențelor fiecărui microorganism are o importanță cu totul deosebită în practica de laborator și în cea industrială (biotehnologie), deoarece permite reglarea activității microorganismelor, fie în direcția obținerii de masă celulară, fie a unor produși de metabolism.

În numeroase cazuri s-a demonstrat că acele condiții care asigură producerea de masă celulară maximă nu sînt obligatorii aceleași care determină acumularea maximă a unui anumit produs de metabolism. Spre exem-

plu, *Aspergillus niger* produce o concentrație maximă de acid citric în mediu cînd creșterea miceliului este semirestrictivă, prin asigurarea unor concentrații de semiînfometare cu N, P și urme de metale, dar cu o concentrație mare de zahar în mediu. De asemenea, în cazul unor microorganisme aerobe, facultativ anaerobe, cultivarea în condiții aerobe produce o mai mare cantitate de masă celulară decît prin metabolizarea unei cantități egale de substrat în condiții anaerobe. De aceea, cînd se urmărește obținerea unui produs de metabolism anaerob este profitabil să se realizeze inițial acumularea unei populații bogate de celule prin cultivare aerobă și apoi să se asigure posibilitatea de a metaboliza restul de substrat în condiții de anaerobioză. Conversia substratului în produs util este realizată în acest fel mult mai repede decît în cazul în care celulele se dezvoltă lent, de la început în condiții complet anaerobe. Acest principiu a fost exploatat cu succes în cazul fermentației alcoolice cu levuri.

DIFUZIA ȘI TRANSPORTUL SUBSTANȚELOR PRIN MEMBRANELE CELULARE

Creșterea și multiplicarea microorganismelor sînt condiționate de pătrunderea nutrienților esențiali prin învelișurile celulare și de eliminarea unor substanțe rezultate din catabolism, împiedicînd însă pierderea din celulă a substanțelor necesare. Toate microorganismele au structuri-barieră și adevărate porți moleculare care asigură integritatea lor și limitează intrarea și ieșirea anumitor compuși chimici. Datorită acestor structuri, celula bacteriană, spre exemplu, nu este niciodată într-o stare de echilibru în raport cu mediul înconjurător în ceea ce privește concentrația diferitelor substanțe de cele două părți ale membranelor celulare (fig. 5). Unele substanțe trec liber de cele două părți ale membranei, dar cele mai multe nu pot fi transportate numai sub impulsul gradientului de concentrație, în așa fel încît transportul lor este condiționat de intervenția unor mecanisme speciale. Microorganismele, ca și alte tipuri de celule, au dezvoltat în cursul evoluției o serie de sisteme diferite de transport, care pot fi deosebite prin metode biochimice, genetice și prin modul lor de acțiune. În funcție de mecanismele fizicochimice care stau la baza lor, modalitățile generale de transport prin membranele biologice ale electroliților și neelectroliților sînt: difuzia pasivă, difuzia facilitată, translocația de grup, transportul activ și endocitoza.

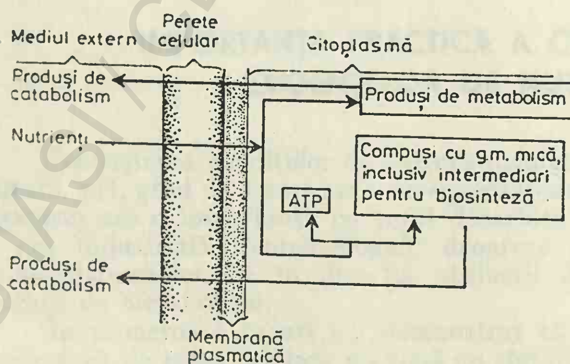


Fig. 5. — Reprezentarea schematică a fluxului nutrienților și a produșilor de catabolism prin membranele celulare la microorganisme (după Doelle, 1981).

DIFUZIA PASIVĂ

Difuzia pasivă (simplă, liberă sau nemediată) este procesul de trecere liberă a substanțelor solubile prin membrana plasmatică, fără a interacționa cu moleculele din structura acesteia și fără consum de energie. Se admite că, în general, moleculele cu grad ridicat de solubilitate în lipide traversează mai ușor regiunea hidrofobă a membranei, deși acest comportament nu are caracter de generalitate. Există cazuri în care tranzitul anumitor substanțe liposolubile prin membrane se realizează relativ greu. Întrucît concentrația celor mai mulți metaboliți este mai mare în interiorul decît în afara celulei, difuzia pasivă este restrînsă, pe lîngă apă, la un mic grup de substanțe (unele gaze, ca O_2 și CO_2, acizii grași și substanțele liposolubile, anumiți ioni). Astfel, la *E. coli*, Na^+ poate fi transportat și prin difuzie pasivă, iar K^+ și Mg^{2+} numai prin transport activ; multe bacterii însă, folosesc transportul activ și pentru Na^+.

Condiția esențială pentru trecerea prin difuzie este mărimea moleculei. Trec ușor moleculele cu $\varnothing$ de $\sim 0{,}4-0{,}6$ nm. Cele care depășesc 0,8 nm trec fie prin difuzie pasivă, dacă sînt liposolubile, fie prin transport activ, dacă au afinitate pentru un sistem de transport.

Difuzia pasivă*) se produce lent și nespecific, de la o regiune cu concentrație relativ mare în substrat spre o regiune cu o concentrație relativ scăzută, și încetează cînd compusul respectiv ajunge la aceeași concentrație atît în interiorul, cît și în afara celulei.

Forța de propulsare este reprezentată de diferențele de concentrație (pentru neelectroliți), de presiune parțială sau de potențial electric (în cazul ionilor), iar intensitatea difuziei nete depinde de diferența de concentrație inițială (sau de gradient) între cele două regiuni.

MECANISMELE DE TRANSFER PRIN MEMBRANE, MEDIATE DE MOLECULE-PURTĂTOR SPECIFICE

Foarte adesea, exigențele de metabolism ale microorganismelor cer ca o mare varietate de molecule să pătrundă simultan în celule, chiar împotriva unui gradient de concentrație, fără să interfere, putînd să se acumuleze în concentrații de sute sau de mii de ori mai mari decît la exterior. În multe cazuri, aceeași substanță poate folosi mai multe sisteme de transport. Mecanismele specifice, mediate, de transport folosesc molecule-transportor situate, de obicei, în membrana celulară, care fixează substanțele dizolvate de o parte a membranei și le transportă de partea opusă (o distanță de $\sim 7{,}5$ nm), (fig. 6). Există trei tipuri de procese de transport mediate de molecule-purtător: 1) difuzia facilitată; 2) translocația de grup; 3) transportul activ.

---

*) Difuzia nu trebuie confundată cu *osmoza*, care implică deplasarea moleculelor de apă prin membrane semipermeabile și în care apa difuzează dintr-o zonă în care se găsește în concentrație ridicată (respectiv de la o concentrație mică de substanțe dizolvate) spre zona cu concentrație mare de substanțe dizolvate.

Demonstrarea existenței sistemelor de transport. Numeroase fapte de observație demonstrează capacitatea microorganismelor de a selecta substanțele care trebuie preluate din mediu și de a le acumula în celule.

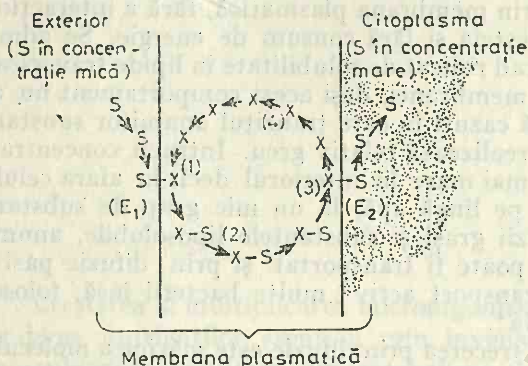


Fig. 6. — Teoria moleculei-purtător în transportul activ. 1. Substratul „S" se combină cu molecula-purtător „X" pe suprafața externă a membranei plasmatice. Reacția este catalizată de enzima E_1. 2. Complexul molecular „S—X" difuzează pe fața internă a membranei. 3. Enzima E_2 catalizează disocierea complexului „S—X" și substratul este eliberat în citoplasmă. 4. Moleculele-purtător se reîntorc spre exterior pentru a relua ciclul (după Price, 1979).

Una dintre primele probe a fost furnizată de Gale (1947), care a arătat că *S. faecalis* poate acumula mari cantități de aminoacizi diferiți, ce nu pot fi extrași din celulele intacte, dar pot fi recuperați după distrugerea acestora. Unii dintre acești aminoacizi sînt acumulați numai dacă celula găsește în mediu o sursă utilizabilă de energie (de exemplu, glucoza), ceea ce demonstrează că bacteriile sînt impermeabile pentru acești aminoacizi, pe care îi înglobează printr-un proces unidirecțional ce necesită consum de energie. Impermeabilitatea membranelor bacteriene pentru anumite categorii de substanțe a fost demonstrată și de faptul că există numeroase exemple de substanțe prezente în mediu, care nu pot fi utilizate, deși extractele celulare conțin enzimele necesare pentru metabolizarea lor.

Existența unor sisteme active de transport a fost demonstrată de Doudoroff (1949), care lucrînd cu mutante de *E. coli* a demonstrat că, spre deosebire de tulpinile sălbatice, acestea metabolizează glucoza produsă intracelular (spre exemplu, prin degradarea maltozei), dar nu pot folosi glucoza prezentă în mediul extern. În unele cazuri, proteinele-purtător care asigură transportul substraturilor în celule au caracterele enzimelor inductibile, adică se formează numai ca răspuns la prezența substratului specific în mediu. Formarea lor poate fi împiedicată prin tratarea bacteriilor cu substanțe care inhibă sinteza proteinelor sau prin mutații consecutive iradierii cu UV, care produc alterări la nivelul determinanților genetici corespunzători. Caracterul inductibil al sistemelor de transport explică faptul că unele bacterii utilizează anumite substanțe prezente în mediu numai după o perioadă de latență prelungită, deși celulele lor conțin tot timpul enzimele necesare. Studiile cele mai aprofundate privind elucidarea mecanismelor de transport au fost efectuate în special la *E. coli* prin utilizarea mutantelor și analogilor marcați cu izotopi ai unor glucide naturale, care sînt preluați de aceleași sisteme ce transportă substanțele normale. Afinitatea celulelor pentru analogii marcați este similară celei a enzimelor pentru un anumit substrat. Înglobarea are loc numai dacă bacteriile au fost cultivate anterior în prezența lactozei sau a analogilor ei, care au indus formarea sistemului de înglobare.

Un progres important a fost reprezentat de identificarea şi izolarea unei proteine specifice a *E. coli*, produs al genei *Y* care codifică sistemul de transport al β-galactozidelor. Această proteină specifică este prezentă în membrana plasmatică a *E. coli* numai dacă celulele acesteia posedă un sistem de transport al β-galactozidelor funcţional (y^+). Proteina respectivă (proteina M) are g.m. ~ 20 000 dal şi formează 0,35% din proteinele totale prezente în celulele de *E. coli* complet induse în prezenţa lactozei. Ea nu poate fi îndepărtată din membrană prin extracţie simplă cu soluţii tampon (Jones şi Kennedy, 1969). În sfîrşit, Heppel şi colab. (1972) au izolat de la *E. coli* proteine de legare prezente în spaţiul periplasmic, active în transportul galactozei şi altor zaharuri, al aminoacizilor şi unor săruri anorganice.

Date importante privind mecanismele moleculare ale transportului prin membranele biologice au fost obţinute prin studiul „veziculelor membranare" şi al liposomilor. Aceste vezicule sînt structuri cu ∅ de 0,1—1,5 μm, obţinute prin liza osmotică a sferoplaştilor unor bacterii Gram-negative, în medii care conţin RN-ază şi DN-ază (Kaback, 1972, 1973). Se obţin astfel, fragmente de membrane plasmatice, care păstrează pe faţa lor externă lipopolizaharidele membranei externe şi care, suspendate în soluţii tampon, „se reînchid" formînd structuri veziculare lipsite de citoplasmă, delimitate de membrana celulară, osmotic active, care preiau substanţele dizolvate din mediu ca şi celulele intacte. În prezenţa unor surse de energie disponibile în mediu, aceste vezicule înglobează şi reţin o serie de substanţe din mediu, inclusiv zaharuri şi zaharuri fosforilate, cu un patern care mimează pe cel al celulelor din care sînt preparate. În cazul sistemelor de transport inductibile (de exemplu, cel al β-galactozidazei de la *E. coli*), înglobarea are loc numai în veziculele preparate din membranele unor celule induse sau ale unor celule la care sistemul de înglobare este constitutiv. Ca şi în cazul celulelor întregi, adăugarea de inhibitori ai producerii de energie celulară (spre ex., 2,4-dinitrofenol, care decuplează fosforilarea oxidativă în mitocondrii şi la procariote) blochează transportul activ şi îl transformă într-un proces de difuzie facilitată, deşi veziculele nu fac fosforilare oxidativă.

DIFUZIA FACILITATĂ

Difuzia facilitată, mediată fără consum de energie este un proces care, spre deosebire de difuzia pasivă, se realizează prin intervenţia unor proteine membranare cu rol de purtător specific. Ea reprezintă cea mai simplă modalitate de a efectua introducerea specifică a unui substrat în celula bacteriană, prin legarea lui de o proteină pe o parte a membranei, urmată de eliberarea de partea opusă. Substratul apare în celulă în aceeaşi formă chimică în care este prezent în mediu. Transportul nu necesită consum de energie, deoarece forţa de propulsie este diferenţa de concentraţie a substanţelor dizolvate. În cazul transportului diferitelor substraturi metabolizabile de la exterior spre interior, deplasarea prin acest mecanism este asigurată de reacţiile intracelulare ale metabolismului, care preiau şi

utilizează substratul, asigurînd menținerea lui în concentrații interne scăzute. Datorită acestor particularități, difuzia facilitată este un proces de transport ,,la vale'', a cărui funcționare duce la echilibrarea gradientului chimic, prin egalizarea concentrației în celulă și în mediu, după care încetează: proteinele-purtător ajută transportul transmembranar al diferitelor substanțe numai atît timp cît între cele două părți ale membranei există o diferență de concentrație a substratului respectiv.

Difuzia facilitată evoluează în trei faze: 1) recunoașterea specifică a moleculei de substrat de către proteina-purtător; 2) translocația substratului prin membrană, datorită probabil unei modificări conformaționale a purtătorului și 3) disocierea complexului substrat — purtător pe partea opusă a membranei. Moleculele-purtător pot reacționa cu substratul la suprafața extra- sau intracelulară a membranei plasmatice, în așa fel încît substratul poate fi transportat *în* sau *din* celulă.

Descrisă la *E. coli* și *Salmonella typhimurium*, difuzia facilitată ar fi în mod deosebit activă în cazul levurilor și al bacteriilor anaerobe, la care asigură intrarea în celule a nutrienților și eliminarea produșilor rezultați din fermentație.

TRANSLOCAȚIA DE GRUP

Translocația de grup (fosforilarea vectorială) este procesul de transport și de acumulare a unor substanțe în celula bacteriană, nu ca atare, ci ca derivați fosforilați. Procesul se deosebește atît de difuzia facilitată, cît și de transportul activ, prin faptul că substanța transportată este modificată chimic în cursul procesului de transport — prin conversie enzimatică într-un derivat fosforilat al său — în așa fel încît nu apare în celulă în forma în care se găsea în mediu, ci ca un derivat chimic care ulterior este metabolizat pe căile normale. Datorită faptului că produsul care pătrunde în celulă este chimic diferit de cel din exterior, nu se produce o concentrare a substratului în celulă, în sensul propriu al cuvîntului, deși concentrația intracelulară a substratului *modificat* poate fi mult mai mare decît a celui din care provine din mediu. Experimental s-a demonstrat că membrana plasmatică a *E. coli* este puțin permeabilă pentru glucoză, ca și pentru alte glucide. Acestea nu pot difuza liber în și din celula bacteriană.

Kundig și Roseman (1964) au demonstrat că transportul glucozei la *E. coli*, ca și la *S. typhimurium* are loc sub formă de glucozo-6-fosfat, utilizînd fosfoenolpiruvatul (PEP) ca donator de fosfat și un complex enzimatic numit *sistemul fosfoenolpiruvat-glucozotransferazei* sau *sistemul fosfotransferazei*. Acest sistem funcționează și pentru alte zaharuri ca: fructoza, sorboza și manoza, ca și pentru unii alcooli ca sorbitolul și manitolul. El este funcțional la microorganisme chimio- și fototrofe, anaerobe stricte și facultative și pare să fie absent — cu foarte rare excepții — la organismele strict aerobe (Romano, 1970; Konings, 1983).

Biochimia translocației de grup. După Saier (1979), înglobarea zaharului modificat necesită participarea unor enzime și molecule solubile, care catalizează transferul părții fosforil a fosfoenolpiruvatului (PEP) la substratul de transferat. Acestea sînt:

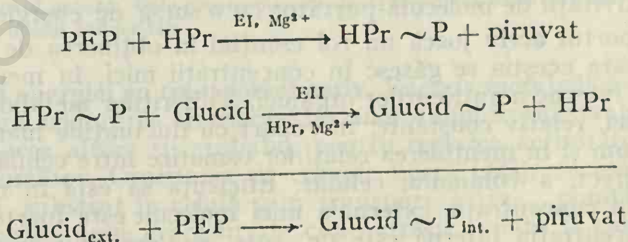
Enzima I (E I), izolată de la *E. coli* și *S. typhimurium*, are masa moleculară (M) ~ 70 000 dal, iar cea de la *S. aureus* ~ 80 000 dal. Este activă în transferul grupării fosforil de la PEP cu formare de E I ~ P și piruvat, după care transferă gruparea fosforil la HPr.

H-proteina (HPr) are o moleculă mică (M ~ 8 500 — 9 500 dal, după specia din care provine). Conține două resturi de histidină (de unde și denumirea de histidin-proteină), dintre care unul este fosforilat de E I ~ P. A fost numită inițial HPr (engl. heat = căldură), fiind descrisă ca termostabilă la 100°C. HPr, ca și E I sînt proteine care funcționează nespecific în procesul de cuplare a energiei și sînt necesare pentru fosforilarea tuturor glucidelor care pot fi transportate pe calea acestui sistem. HPr, ca și E I nu sînt legate de membrane, ci fac parte din constituenții citosolului.

Enzima II. HPr ~ P transferă gruparea fosforil la o proteină specifică a sistemului, enzima II, care este o enzimă inductibilă, situată în structura membranei, ca o proteină integrată, probabil capabilă de modificări conformaționale. Este alcătuită din două subunități: II A, care poartă situsul de specificitate pentru un anumit glucid, fapt evidențiat și în denumirea ei (spre exemplu, E II A^{glu}, pentru glucoză), și II B (M ~ 36 000 dal), cu o funcție nespecifică (component comun al E II pentru toate hexozele), avînd probabil și alte funcții, deoarece reprezintă ~ 10 % din proteinele membranare la *E. coli* (Boos, 1974; Postma și Rojeman, 1976). E II ar conține și anumite fosfolipide necesare pentru activitate (Kornberg, 1973).

În concluzie, translocația de grup este o formă de transport cu orientare vectorială: substratul este preluat de pe partea externă a membranei și forma sa fosforilată este eliberată în celulă. Transportul este unidirecțional: glucidul fosforilat nu poate fi eliminat din celulă, deoarece în această stare nu are afinitate pentru proteina-purtător. HPr are situsuri specifice de recunoaștere și de legare a zaharului, active în translocație și în fosforilarea ulterioară a substratului.

Enzima III. În unele cazuri (de exemplu, la stafilococ), în reacție participă și enzima III, o proteină specifică, solubilă, periferică, cu M ~ ~ 20 000 dal, implicată în transferul grupărilor fosforil de la HPr la E II legată de membrană (fig. 7). Ca și E II, E III are specificitate de substrat și funcționează numai în transportul unui singur glucid sau al unor glucide foarte înrudite. Reacția globală care necesită Mg^{2+} are ca rezultat final producerea de glucid fosforilat, care intră în celulă, și de piruvat:



$$\text{PEP} + \text{HPr} \xrightarrow{\text{EI, } Mg^{2+}} \text{HPr} \sim \text{P} + \text{piruvat}$$

$$\text{HPr} \sim \text{P} + \text{Glucid} \xrightarrow[\text{HPr, } Mg^{2+}]{\text{EII}} \text{Glucid} \sim \text{P} + \text{HPr}$$

$$\text{Glucid}_{ext.} + \text{PEP} \longrightarrow \text{Glucid} \sim \text{P}_{int.} + \text{piruvat}$$

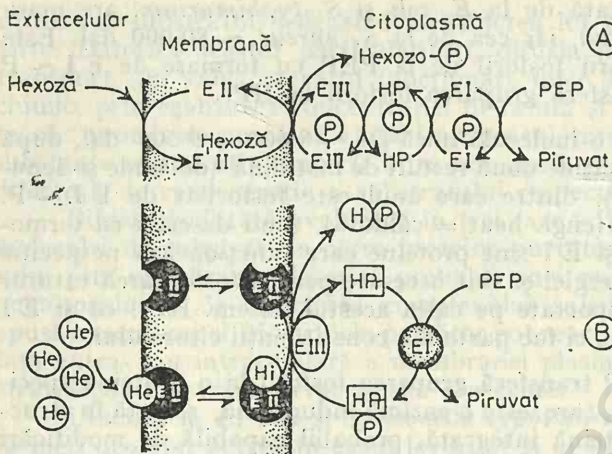


Fig. 7. — Reprezentarea schematică a reacţiilor biochimice asociate cu translocaţia de grup a glucidelor, mediată de sistemul fosfotransferazelor la *E. coli* şi *Salmonella typhimurium*. A. Modelul general. B. Reprezentare de detaliu a reacţiilor de transport ale hexozelor. E I — enzima I; E II — enzima II; E III — enzima III; PEP — fosfoenolpiruvat; HPr — proteina H; P — compus fosforilat; He — hexoză externă; Hi — hexoză internă (după Weide, 1979).

TRANSPORTUL ACTIV

Transportul activ este procesul prin care diferite substanţe solubile (β-galactozide, alte zaharuri, aminoacizi, peptide, nucleotide şi ioni) sînt „pompate" în celulă, prin membrana plasmatică, pentru a se acumula, nemodificate chimic, în concentraţii de sute şi mii de ori mai mari decît în exterior.

Acest mod de transport are două caracteristici esenţiale : 1) existenţa unor proteine specifice cu rol de purtător sau de transportor, care conţin un situs de legare complementar pentru substratul respectiv ; 2) spre deosebire de difuzia pasivă, în care deplasarea moleculelor solubile se poate face în orice direcţie, în funcţie de concentraţia relativă a substratului, în compartimentul intra- şi extracelular, în transportul activ, molecula-purtător este „energizată" pentru a face transportul unidirecţional (împotriva gradientului de concentraţie), printr-un proces în care energia derivată din căile metabolice majore este cuplată cu transportul, pentru a pune în funcţie efectul de „pompă". Procesul poate fi asimilat cu propulsarea unui lichid „la deal", contra gravitaţiei, care nu se poate face fără consum de energie. Deoarece unele sisteme de transport activ pot funcţiona şi ca sisteme de difuzie facilitată cînd nu au o sursă de energie, se consideră că ele ar cuprinde două subunităţi sau două situsuri : unul capabil să recunoască, să lege şi să transporte substratul şi cel de-al doilea, necesar pentru cuplarea activităţii de moleculă-purtător cu o sursă de energie.

Transportul activ joacă un rol esenţial în obţinerea de nutrienţi, în mediile în care aceştia se găsesc în concentraţii mici, în menţinerea unor concentraţii interne a nutrienţilor organici, a diferiţilor metaboliţi şi electroliţi anorganici, relativ constante, în raport cu fluctuaţiile mari din mediul extern, precum şi în menţinerea relaţiilor osmotice între celulă şi mediu şi, în mod indirect, a volumului celular. Eficienţa sa este în mod deosebit evidentă cînd concentraţia externă a unei molecule este foarte scăzută, în timp ce concentraţia internă este de sute de ori mai mare. În cazul

E. coli cultivată pe un mediu cu lactoză, aceasta poate fi acumulată în celulă pînă la o concentrație care reprezintă ~4% din masa bacteriană totală (Rickenberg și colab., 1956). De aceea, are o importanță deosebită pentru microorganismele care trăiesc în medii naturale cu concentrații mici de substanțe nutritive sau în cele cu un dezechilibru cantitativ al diferiților constituenți, care nu s-ar putea hrăni numai prin difuzie, deoarece nu ar putea prelua substanțele nutritive în concentrațiile necesare pentru creștere și multiplicare.

Diferitele categorii de microorganisme utilizează cele trei sisteme de înglobare a diferitelor substraturi din mediu în grade variate în funcție de natura lor și de măsura în care caracteristicile acestora sînt potrivite condițiilor de dezvoltare și exigențelor metabolismului lor (tabelul nr. 11).

Tabelul nr. 11

Caracteristicile mecanismelor de transport ale microorganismelor

Tipul de transport		Caracteristici
Difuzia pasivă		Proces nespecific, limitat la H_2O, O_2, CO_2, acizi grași, substanțe liposolubile, fără participarea proteinelor din membrana celulară și fără consum de energie. Final, concentrația substratului în afara și în interiorul celulei este egală.
Sisteme de transport**) mediate de proteine-purtător	Difuzia facilitată	Proces stereospecific*), fără consum de energie, cu participarea proteinelor-purtător. Concentrația substratului în interiorul celulei nu este mai mare decît aceea din mediu.
	Translocația de grup	Proces stereospecific*), cu consum de energie și participarea unei proteine-purtător. Substratul este modificat chimic de sistemul fosfotransferazelor, în cursul transportului. Transport unidirecțional spre interior. Concentrația substratului în celulă poate fi mai mare decît în mediu (dar modificat chimic).
	Transportul activ	Proces stereospecific*), cu consum de energie și participarea proteinelor-purtător. Concentrația substratului în celulă poate fi de cîteva sute sau mii de ori mai mare decît extracelular.

*) Stereoizomerul biologic activ este transportat selectiv.
**) Sub control genetic. Cele răspunzătoare de transportul substraturilor catabolizabile sînt de obicei inductibile.

Cuplarea energiei cu transportul activ. Energia metabolică este absolut necesară pentru asigurarea transportului unor anumite substanțe în celulă, pentru eliminarea altora și, probabil, pentru reglarea activității sistemelor de proteine-purtător. Cantitatea de energie liberă (ΔG), necesară pentru a concentra un substrat în celulă prin transport activ, „pompîndu-l" prin membrană contra unui gradient de concentrație, poate fi calculată prin

ecuaţia :

$$\Delta G = 1{,}386 \log_{10} \times \frac{\text{concentraţia internă}}{\text{concentraţia externă}} = \text{cal/mol.}$$

Dacă, spre exemplu, $\frac{\text{concentraţia internă}}{\text{concentraţia externă}} = 10^3$;

$\Delta G = 3 \times 1{,}386 = 4{,}158$ cal/mol.

După Saier (1979), microorganismele pot cupla mai multe tipuri de energie cu transportul activ, între care sînt citate : 1) energia chimică furnizată de clivarea ATP la ADP şi Pi ; 2) energia electrică rezultată în cursul proceselor de oxidare prin transportul electronilor de la un donator de electroni cu potenţial reducător înalt la O_2 (fără a trece prin stadiul de ATP) ; 3) energia luminoasă în cazul bacteriilor fototrofe şi al celor din genul *Halobacterium* etc.

Energia eliberată din hidroliza ATP ar putea favoriza modificarea conformaţională a proteinelor-purtător şi „rotirea" lor sau ar induce deschiderea canaliculelor, prin care ionii menţinuţi de forţe electrostatice ar putea fi dirijaţi prin membrane. De asemenea, capacitatea de a utiliza energia rezultată din oxidarea a diferite substanţe chimice, respectiv prin transferul electronilor de la un potenţial înalt la unul mai scăzut (spre exemplu, de la acid lactic la O_2, fără nevoie de $\sim$ P), reprezintă un avantaj biologic, deoarece transferul de electroni de la diferite substanţe organice la O_2, utilizat de celulele vegetale şi animale drept cale majoră de producere de ATP, este folosit direct de către bacterii şi ca sursă de energie pentru transportul activ, fără să treacă prin ATP. Faptul că ATP şi/sau transportul de electroni pot furniza direct energia necesară transportului activ este important nu numai pentru bacteriile aerobe şi fototrofe, ci şi pentru mulţi anaerobi care produc ATP numai prin fosforilare la nivelul substratului, fiind lipsiţi de sisteme transportoare de electroni. Atît hidroliza ATP, cît şi transferul de electroni, eliberînd energie, creează o stare de membrană „energizată".

În acord cu teoria chemiosmotică a lui Mitchell, cele două procese sînt orientate în membrană în aşa fel încît determină formarea unui gradient electrochimic, rezultat din acumularea protonilor (H^+) în afara membranei şi a ionilor hidroxil $(OH)^-$ în interiorul ei, ceea ce duce la stabilirea în membrană a unui potenţial electric de $\sim$ 200 milivolţi, cu zona interioară negativă. Energia stocată în gradientul protonic (forţă protonmotrice), ca într-un condensator electric, este utilizată pentru „pomparea" substanţelor din mediu în celulă şi, de asemenea, pentru a genera ATP, necesar pentru funcţiile celulare. Invers, ATP produs prin activitatea metabolică a celulei poate fi utilizat pentru a crea starea de membrană „energizată" (Luria, 1975). În acest fel, interconversia diferitelor forme de energie, demonstrată la *E. coli* iniţial pentru energia chimică şi chemiosmotică prin intermediul funcţiei ATP-azei, favorizează intrarea în acţiune a acestor „pompe moleculare" esenţiale pentru transportul activ (fig. 8).

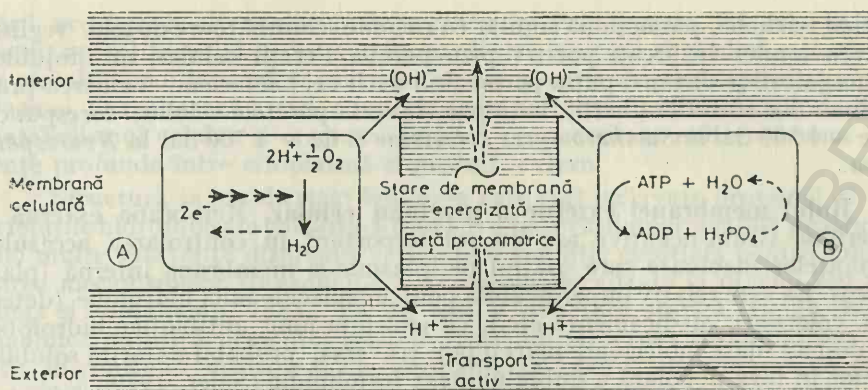


Fig. 8. — Starea de membrană energizată rezultă fie din transportul electronilor de la diferite substraturi la oxigen, fie din hidroliza ATP la ADP şi acid fosforic. Ambele sînt orientate în membrană în aşa fel încît determină acumularea protonilor (H^+) pe faţa externă a membranei şi a ionilor hidroxil $(OH)^-$ pe cea internă. Energia eliberată de cele două procese este stocată ca gradient protonic. Rezultă o forţă „protonmotrice", care activează mecanismele de transport activ şi reacţiile inverse hidrolizei de ATP şi transportului de electroni (săgeţile întrerupte) (după Luria, 1975).

PARTICULARITĂŢI ALE PROCESELOR DE DIFUZIE ŞI TRANSPORT LA BACTERII

Stabilirea mecanismelor prin care numeroşi compuşi hidrofili sînt transportaţi printr-o barieră celulară hidrofobă a făcut obiectul a numeroase cercetări efectuate pe bacterii, care oferă avantajul de a fi obţinute uşor, sub forma unor populaţii mari, omogene, ce pot fi utilizate uşor experimental şi la care aspectele genetice sînt în mare parte lămurite. Deşi cercetările au fost efectuate pe un număr limitat de bacterii *(E. coli, S. typhimurium, B. subtilis)* şi pe unele celule eucariote (eritrocite, celule epiteliale etc.) se poate afirma că există un grad important de similaritate în aspectele fundamentale ale mecanismelor de transport ale nutrienţilor.

Rolul învelişurilor celulare bacteriene în difuzie şi transport. În cazul celulelor bacteriene, fenomenele de difuzie şi transport sînt complicate de prezenţa unor structuri suplimentare, care acoperă membrana plasmatică, aşa cum sînt: peretele celular (în cazul bacteriilor Gram-negative, foarte complex structural şi funcţional), capsula, stratul mucos şi glicocalixul, „tecile" etc. Se apreciază că, în general, glicocalixul, capsula şi stratul mucos, învelişuri în general laxe, au probabil doar o mică influenţă asupra transportului substanţelor dizolvate.

Rolul peretelui celular. În cazul bacteriilor Gram-pozitive s-a demonstrat că peretele celular nu poate fi străbătut de molecule cu g.m. mai mare de 10 000 dal, deşi în unele cazuri intervin, în mod evident, factori mai importanţi decît greutatea moleculară. În transformarea genetică, spre exemplu, peretele celular lasă să treacă moleculele de ADN transformant care pot avea g.m. de cîteva milioane dal. În plus, unii polimeri ai peretelui celular,

ca acizii teichoici, pot acționa similar cu rășinile schimbătoare de ioni, reglînd trecerea ionilor încărcați pozitiv prin perete. Pereții celulari ai drojdiilor și mucegaiurilor sînt mai puțin permeabili decît cei bacterieni. Valoarea-prag a polimerilor sintetici (inerți), care pot traversa peretele celular, corespunde M de ~ 4 500 dal la *Saccharomyces cerevisiae* și de ~ 4 700 dal la *Neurospora crassa*.

Rolul membranei externe a peretelui celular. Membrana externă a bacteriilor Gram-negative are un rol important în controlarea accesului substanțelor dizolvate spre spațiul periplasmic și membrana internă (plasmatică). Ea este relativ impermeabilă pentru molecule mici hidrofobe (detergenți, coloranți, medicamente etc.), cu excepția unor antibiotice hidrofobe, care deși au mase moleculare mari o pot traversa, probabil datorită solubilității lor în faza nepolară a dublului strat fosfolipidic (Saier, 1979).

Funcția de barieră hidrofobă poate fi suprimată prin tratare cu EDTA, care eliberează lipopolizaharidele și proteinele membranei externe. În același timp, membrana externă funcționează ca o sită moleculară permeabilă pentru molecule mici hidrofile, care difuzează pe calea porilor transmembranari, indiferent de natura lor, dacă M nu depășește 600—1 000 dal (Wright și Tipper, 1979).

Tranzitul moleculelor hidrofile este efectuat de trei categorii de proteine, care acționează cu grade diferite de specificitate, formînd adevărate canale transmembranare (Osborn și Wu, 1980) :

1) Proteinele majore ale membranei externe, nnmite și *porine* (Nikaido și Makae, 1976, 1977), ca, de exemplu, PrIa și PrIb de la *E. coli* K 12, Bavoil, 1977), formează pori hidrofili sub forma unor canale fixe transmembranare, care permit difuzia pasivă nespecifică a substanțelor dizolvate, fără vreo interacțiune proteină—substrat. Relativa selectivitate a transportului nu este determinată de o afinitate specială, ci de mărimea substratului în raport cu diametrul porului. La *E. coli* pot trece cu o rată semnificativă numai substanțe cu M ~ 700 dal. Nutrienții cu masă moleculară mai mare au nevoie de intervenția altor constituenți ai membranei externe.

2) Proteinele tip *lam B* și *Tsx*, care au și funcția de receptori pentru fagii λ, respectiv T6, au un rol mai specific și asigură tranzitul unor oligozaharide din seria maltozei, respectiv a unor nucleozide. Ele acționează mai degrabă ca proteine formatoare de pori decît ca proteine-purtător, în sensul clasic al noțiunii .

3) Proteinele de transport ale membranei externe sînt deosebite de cele care formează pori. Ele participă la înglobarea anumitor substanțe dizolvate, cu greutate și dimensiuni relativ mari, prezente în mediu, în general, în concentrație mică. Din această categorie fac parte la *E. coli* receptorii din membrana externă pentru vitamina B_{12} și o serie de alte proteine care îndeplinesc și funcții adiționale ca, de exemplu, pe cele de receptori de fagi și de colicine (Saier, 1979 ; Osborn și Wu, 1980). Funcția acestor proteine care acționează ca un component esențial al unui sistem de transport unic și foarte specific este complexă și încă neelucidată.

Membrana plasmatică bacteriană reprezintă sediul structural al barierei osmotice selective de permeabilitate, care reglează schimburile dintre celulă și mediu, opunîndu-se ieșirii unor constituenți utili din celulă și inva-

dării acesteia de alte molecule de la exterior. Prin aceasta, ea are, pe de o parte, un rol esenţial în interacţiunea dintre bacterii şi mediul extern, iar, pe de alta, coordonează şi controlează compoziţia chimică specifică a citoplasmei. Se realizează astfel, o funcţie de importanţă fundamentală, deoarece metabolismul celular şi creşterea implică cu necesitate existenţa unor diferenţe profunde între citoplasmă şi mediul extern.

Structura sa (dublu strat lipidic în care sînt inclavate proteine) şi proprietăţile hidrofobe ale constituenţilor săi o fac cvasiimpermeabilă pentru cele mai multe substanţe dizolvate, realizînd o condiţie esenţială pentru funcţionarea mecanismelor transductoare de energie localizate la nivelul său (Konings şi Vildakamp, 1983). Ea nu este o structură statică, rigidă, ci una dinamică datorită prezenţei acizilor graşi din structura fosfolipidelor, care sînt în continuă mişcare şi fac, probabil, ca ,,porii'' membranei cu Ø de 0,4—0,5 nm să se deschidă, permiţînd trecerea apei şi a moleculelor mici neelectrolitice dizolvate în ea, sau să se închidă, blocîndu-le complet trecerea (fig. 9). În sfîrşit, un număr mare de proteine membranare sînt

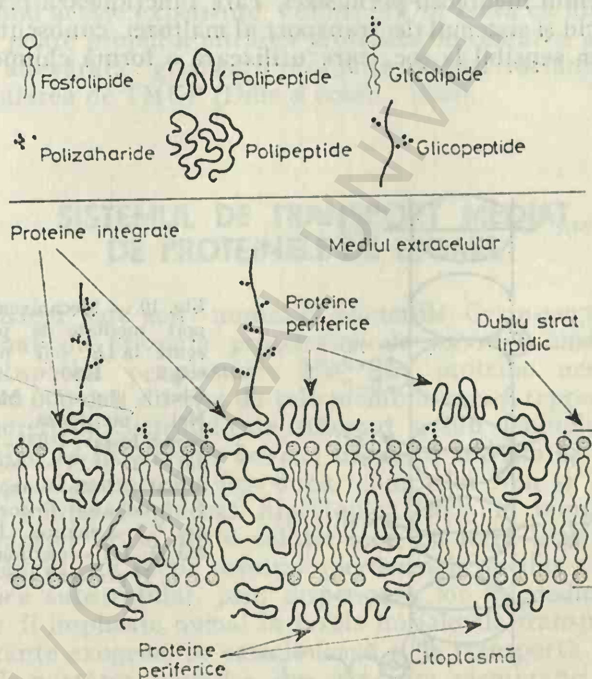


Fig. 9. — Arhitectura moleculară a membranei plasmatice (după Berkaloff, 1981).

implicate în transportul substanţelor dizolvate prin membrană, acţionînd ca molecule-purtător, care asigură un influx controlat al substraturilor metabolizabile şi al ionilor şi efluxul produşilor finali de metabolism. Cu excepţia apei, foarte puţine molecule pot trece liber prin membrana citoplasmatică, transferul lor necesitînd intervenţia unor forţe de acţiune capabile să le pro-

pulseze. În unele cazuri, forţa de acţiune este reprezentată de gradientul de concentraţie de cele două părţi ale membranei, în timp ce în altele transportul este condiţionat de intervenţia unor molecule specifice, cu rol de transportor (purtător), şi de consumul de energie.

Analizînd ansamblul datelor experimentale acumulate pînă în prezent, este evident că bacteriile au dezvoltat în cursul evoluţiei mecanisme prin care transportă transmembranar substanţele dizolvate, prin procese mediate de proteine-purtător, pe care Dills şi colab. (1980) le clasifică, în funcţie de natura sursei de energie metabolică utilizată, după cum urmează : primul mecanism este difuzia facilitată — proces necuplat cu energia metabolică, prin care substratul transportat nu se acumulează; celelalte sisteme sînt numite „active”sau „concentrative”, deoarece fiind cuplate cu consumul de energie asigură acumularea substanţelor transportate contra unui gradient de concentraţie. Ele sînt : translocaţia de grup prin care glucoza, substratul sistemului fosfotransferazei, este fosforilat în cursul transportului; sistemul β-galactozid permeazei care asigură transportul lactozei, utilizînd ca sursă de energie pentru acumularea substratului gradientul electrochimic protonic; sistemul melibiozo permeazei, care funcţionează prin cotransportul Na^+ — glucid şi sistemul de transport al maltozei, cunoscut şi sub denumirea de sistem sensibil la şoc, care utilizează o formă chimică de energie (fig. 10).

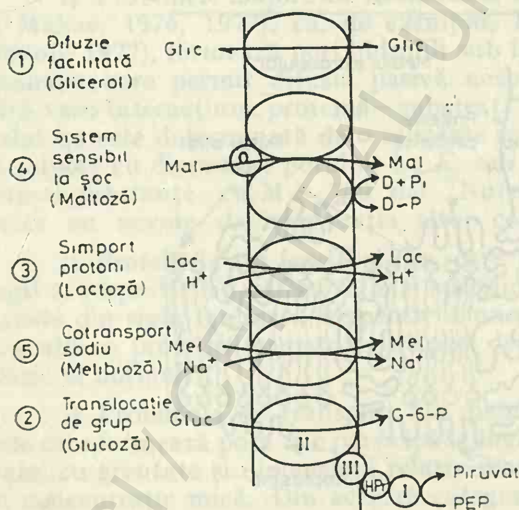


Fig. 10. — Mecanismele de transport mediate de purtători, prezente la *E. coli* (după Dills şi colab., 1980). Glic — glicerol; Gluc — glucoză; Mal — maltoză; Mel — melibioză; G-6-P — glucozo-6-fosfat; PEP — fosfoenolpiruvat; D + Pi — donator nefosforilat + fosfat anorganic; D~P — donator fosforilat macroergic; I — enzima I; II — enzima II; III — enzima III; HPr — H proteină lac — lactoză.

SISTEME DE TRANSPORT CU MOLECULA-PURTĂTOR MOBILĂ. SISTEMUL β-GALACTOZIDAZEI

Primul sistem de transport activ identificat este cel al β-galactozidazei de la *E. coli* (Cohen şi Rickenberg, 1955), care permite bacteriei să folosească lactoza şi să acumuleze în celulă acest diglucid sau analogii lui, în concentraţie de 500 de ori mai mare decît în mediu.

Cohen şi Monod (1956) au demonstrat că sistemul de transport al lactozei ar fi reprezentat de o singură proteină, produs al genei *y*, din operonul *lac* al *E. coli*, diferită de produsul genei *z*, care codifică β-galactozidaza. Această proteină (*β-galactozid permeaza* sau *proteina M*) a fost izolată de Fox şi Kennedy (1976) din membranele plasmatice ale unei tulpini de *E. coli* capabilă să utilizeze lactoza. Ea are M ~ 31 000 dal şi este inserată în membrana citoplasmatică. Lipseşte la mutantele bacteriene y^-, care, în consecinţă, nu pot folosi lactoza. Deşi izolarea proteinei M s-a făcut numai în formă inactivă, prin tehnici biochimice şi genetice s-a demonstrat că ea poartă situsul de recunoaştere şi de transport al lactozei.

Mitchell (1965, 1972) a emis şi confirmat ipoteza că acumularea lactozei în celulele *E. coli* este cuplată cu energia chimică pe calea simportului de protoni. El a demonstrat că adăugarea unui analog nemetabolizabil al lactozei —*tiometil-β-D-galactopiranozid* (TMGP), transportat de permeaza lactozei în celulele bacteriene epuizate energetic, determină un influx de protoni contra gradientului electrochimic, acidificînd compartimentul citoplasmatic şi alcalinizînd concomitent mediul extern.

Confirmînd aceste experienţe, Collins (1976) arată că întrucît gradientul de TMGP poate propulsa intrarea protonilor în celulă şi situaţia inversă trebuie să fie adevărată : gradienţii protonici sau electrochimici propulsează eficient acumularea de TMGP (Dills şi colab., 1980).

SISTEMUL DE TRANSPORT MEDIAT DE PROTEINELE DE LEGARE

Acest sistem este activ numai la bacteriile Gram-negative, deoarece este condiţionat de prezenţa proteinelor de legare („binding proteins") localizate în spaţiul periplasmic. Ele sînt proteine neenzimatice, cu M~20 000—40 000 dal, diferite de cele membranare, şi reprezintă ~2% din proteinele bacteriene. Sistemul este cunoscut şi sub denumirea de *sistem de transport sensibil la şoc osmotic la rece*, deoarece activitatea sa este virtual anulată prin şocul osmotic produs după tehnica lui Neu şi Heppel (1965) : suspendare în soluţie de glucoză hipertonică (20%) în tampon şi EDTA*), urmată de transfer brusc într-o soluţie rece, cu forţă ionică slabă ($MgCl_2$ 5 mM). Procedeul are drept rezultat pierderea în mediu a proteinelor de legare specifice substratului, prin dispersarea lor în mediu. După Kepes (1972), ele ar fi implicate numai în fazele iniţiale ale transportului specific al unor substanţe exogene, pe care le leagă şi le transportă pînă la nivelul unor molecule-purtător ipotetice din structura membranei plasmatice, în aşa fel încît, fiecare moleculă de substrat care ajunge în celulă ar trece obligatoriu prin două reacţii de transport.

Descris iniţial în transportul maltozei la *E. coli* (Kellerman şi Szmelcman, 1974), acest tip de transport funcţionează cu proteine de legare specifice pentru numeroase alte glucide (arabinoză, fucoză, D-galactoză, malto-

*) EDTA — sarea de sodiu a acidului etilen-diaminotetraacetic $(HOOCCH_2)_2NCH_2 \cdot CH_2N\ (CH_2COOH)_2$. Formează complecşi deosebit de stabili cu metalele bivalente şi este agent inhibitor pentru unele enzime metal-dependente.

trioză, maltodextrine, riboză, xiloză), aminoacizi (glutamină, prolină etc.) și acizi organici. Deoarece proteinele de legare pot fi ușor eliberate din celule prin diferite tratamente care afectează integritatea membranei externe a peretelui celular, ele nu sînt considerate ca făcînd parte din categoria proteinelor-purtător propriu-zise, din constituția membranei celulare. Rolul lor este însă cert, așa cum o probează numeroasele cazuri în care eliberarea lor în mediu este însoțită de anularea simultană a activității de transport, pentru substratul față de care au afinitate la bacteria respectivă.

TRANSPORTUL ACTIV CUPLAT CU ACTIVITATEA DEHIDROGENAZEI

Sistemul a fost demonstrat pe suspensii de „vezicule" membranare de *E. coli* și alte bacterii (Kaback, 1972), care păstrează întreaga activitate a sistemelor majore de transport activ, purtătorii de electroni ai lanțului respirator și o serie de enzime legate de structura membranei. Adăugarea de D-lactat în mediu stimulează înglobarea masivă în vezicule a prolinei, a altor aminoacizi și a unor glucide (glucoză, β-galactozide, arabinoză etc.), care pot depăși de sute de ori concentrația externă din mediu.

După modelul lui Kaback (1972), proteinele-purtător s-ar găsi fie în formă oxidată (—S—S—), cu o mare afinitate pentru substrat, fie în formă redusă (—SH HS—), cu o afinitate slabă. Ele suferă un proces ciclic de reducere și reoxidare, sub forma unor interconversiuni sulfhidril ⇄ disulfid. În formă oxidată, proteina-purtător leagă substratul aflat în mediu. Reducerea formei oxidate este însoțită de o modificare conformațională și de scă-

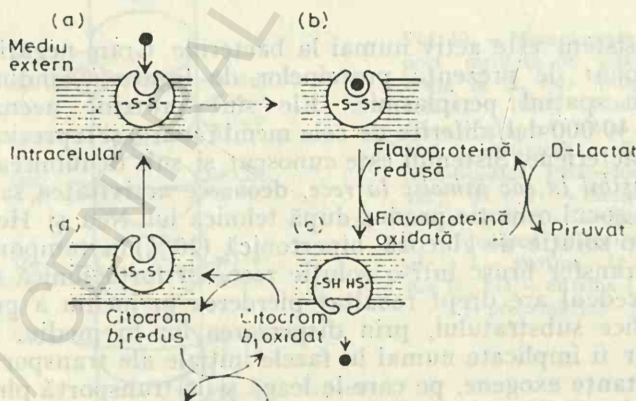


Fig. 11. — Schema transportului unei molecule solvite prin biomembrane, printr-un proces cuplat cu oxidarea lactatului (a—d) (după Rose, 1976).

derea afinității față de substrat, care au drept urmare translocația substratului prin membrană și eliberarea lui în „veziculă". În acest proces, transportul intracelular este condiționat de oxidarea lactatului (substrat donator de electroni) la piruvat, la nivelul membranei, și reducerea proteinei-purtător de către D-lactat dehidrogenază pe calea unei flavoproteine (fig. 11).

După eliberarea substratului în celulă, molecula-purtător este reoxidată, probabil de către o parte a lanțului transportor de electroni (la nivelul cit. b_l), pentru a reface forma oxidată, capabilă să lege o nouă moleculă de substrat. După ipoteza lui Kaback (1972), transportul activ cuplat cu oxidarea D-lactatului este dependent, în mod exclusiv, de respirație, în sensul că unul sau mai mulți purtători de electroni din lanțul respirator al membranei bacteriene ar funcționa nu numai pentru a transporta electroni, ci și pentru transportul unor glucide și aminoacizi. Pentru fiecare pereche de electroni transportați de la donatorul de electroni la O_2 ar fi transportată din mediu în vezicula de membrană o moleculă de substrat.

Deși descoperirea transportului activ mediat de dehidrogenază în ,,veziculele'' de membrane este considerată ca un fenomen esențial pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale transportului activ la microorganisme, pînă în prezent nu există probe categorice privind funcționarea lui la celulele bacteriene intacte sau la microorganismele eucariote.

ROLUL PROTEINELOR-PURTĂTOR. ETAPA DE TRANSLOCAȚIE

După descoperirea sistemului specific de înglobare și acumulare a β-galactozidelor la *E. coli*, Cohen și Monod (1957) au propus denumirea de *permeaze*, ca termen generic pentru toate moleculele care catalizează transportul activ, avînd avantajul că semnificația generală și scopul activității proteinelor pe care le desemnează sînt imediat înțelese. Deoarece permeazele nu sînt de natură enzimatică și, ca atare, nu participă în metabolizarea intracelulară a substratului transportat. Kornberg (1973) propune înlocuirea acestui cuvînt elegant cu acela mai greoi, dar mai puțin eronat, de ,,sistem de înglobare'' (,,uptake system''). Cu toate acestea, termenul de permeaze continuă să fie folosit, alături de cel generic de proteine-purtător.

Permeazele reprezintă o categorie de proteine funcțional specializate, inserate în membrana plasmatică, specifice pentru fiecare substanță dată sau pentru substanțe foarte înrudite chimic, avînd rolul de a mări viteza de trecere a moleculelor dizolvate prin biomembrane, de cîteva sute de ori, în raport cu difuzia liberă. Au mase moleculare cuprinse între ∼ 30 000 și 50 000 dal și se găsesc în număr de ∼ 1 000 — 2 000 molecule din fiecare tip per celulă bacteriană. Au capacitatea de a decela cantități foarte mici de substanțe dizolvate (∼ 10^{-6} M pentru β-galactozide). Prezența lor este esențială pentru introducerea substanțelor în celulă contra unui gradient de concentrație, dar este utilă și pentru transportul spre exterior. Eliberarea substanțelor din celule implică în mod obișnuit un transport ,,la vale'' și este, probabil, deopotrivă mediată de un purtător, dar nu se știe dacă cele două procese (de intrare și de ieșire din celulă) folosesc aceeași permează.

Semnificația biologică a permeazelor pentru creșterea optimă a bacteriilor este demonstrată de existența mutantelor care au pierdut capacitatea de a le sintetiza și care devin dependente de înglobarea nutrienților numai prin difuzie pasivă. Celulele mutante nu se dezvoltă, comparabil cu cele parentale, nici în cazul în care concentrația extracelulară a nutrienților este mărită de 1 000 de ori.

MECANISMUL MOLECULAR AL TRANSLOCAȚIEI MEDIATE DE PROTEINE-PURTĂTOR PRIN MEMBRANE

Teoretic, proteinele-purtător și-ar putea îndeplini funcția pe două căi : 1) *ca proteine inclavate,* capabile de modificări conformaționale, care le permit să lege molecule de substrat sau ioni la suprafața celulei și să le transporte în interior (fig. 12) sau 2) *ca proteine mobile,* capabile să lege un

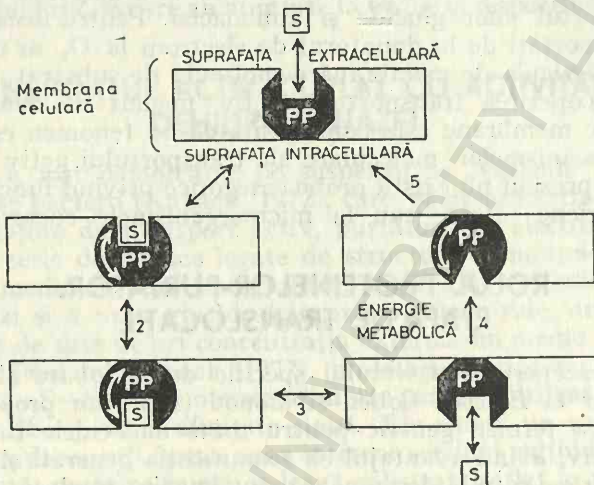


Fig. 12. — Rolul proteinelor-purtător (PP) în transportul activ al unei substanțe (S) din spațiul extracelular, unde se găsește în concentrație mică, în interiorul celulei. După ce S a trecut intracelular (1,2) proteina-purtător revine la forma sa inițială, imobilă (3). Modificarea formei sale și rotația necesară pentru prezentarea situsului de legare spre exterior necesită consum de energie metabolică (4, 5) (după Fox, 1972).

substrat și să se deplaseze cu el prin membrană (fig. 13), prin mișcări de translocație, rotație sau vibraționale (Kepes, 1973). Cele două ipoteze se bazează pe caracterul fluid al membranei plasmatice și pe capacitatea contituenților săi de a se deplasa lateral în stratul bidimensional, care pot sexplica modificările ce survin atît în conformația proteinelor membranare, cît și în aranjamentul și asocierea lor.

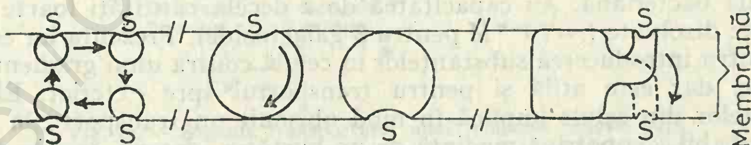


Fig. 13. — Reprezentarea schematică a unui transportor mobil. De la stînga la dreapta sînt reprezentați transportori animați de mișcări de translație, de rotație și respectiv de vibrație (după Kepes, 1973).

După ipoteza lui Kepes, β-galactozid permeaza ar avea comportamentul unui transportor mobil, care posedă un situs de afinitate pentru substratul transportat și poate prezenta acest situs fie spre exterior, fie spre interior, niciodată spre ambele fețe simultan. Activitatea sa este deter-

minată de capacitatea de a prezenta mobilitate în membrană asociată cu tranziţia între două stări conformaţionale : forma M, în care situsul de legare pentru substratul transportat este îndreptat spre exteriorul membranei, şi forma M_1, cînd situsul respectiv este îndreptat spre interior. Tranziţia între cele două configuraţii permite ca, teoretic, în fiecare din cele două poziţii să poată avea loc reacţii de asociere sau de disociere cu substratul. Practic, permeaza se comportă ca o uşă turnantă. În forma M, ea leagă lactoza la suprafaţa externă a membranei plasmatice, formînd complexul β-galactozid—proteină M. În prezenţa unei surse de energie, proteina M suferă tranziţia la forma M_1 (îşi modifică forma, este capabilă de rotaţie şi prezintă situsul de legare spre interiorul celulei). În această poziţie, ea are o afinitate mică pentru glucid, pe care îl eliberează în celulă. Pentru a suferi o nouă modificare conformaţională, care să-i permită rotirea şi prezentarea situsului de legare din nou spre exterior, este necesar un consum de energie. Cuplajul de energie are, deci, ca scop transformarea sistemului de transport, în esenţă simetric, într-un sistem funcţional asimetric, care asigură un transport unidirecţional. Sub influenţa cuplajului energetic, permeaza este modificată în aşa fel încît situsul său de afinitate îndreptat spre interiorul celulei devine inaccesibil pentru transportul substratului înapoi, în timp ce afinitatea pentru substratul extern rămîne mare. Mobilitatea proteinelor-transportor în membrana plasmatică este favorizată de prezenţa acizilor graşi nesaturaţi, a căror structură şi proporţie relative determină caracterul fluid al acesteia la 37°C. Fox (1972) a demonstrat că rata transportului poate fi de ~ douăzeci de ori mai mare cînd proporţia acizilor graşi nesaturaţi în membranele lipidice este crescută, în raport cu membranele în care aceşti compuşi se găsesc în cantitate mică.

Ipoteza modificărilor conformaţionale, asociată cu o scădere a afinităţii faţă de substrat pe suprafaţa internă a membranei, sub influenţa cuplării de energie, pare logică şi se bazează, în special, pe interacţiunile dintre subunităţile proteinelor alosterice. De aceea, ea este admisă de numeroşi autori, deşi faptele experimentale în favoarea sa sînt puţine. Ea nu exclude, după unii autori, rolul lipidelor membranare în fixarea proteinelor-purtător şi chiar participarea lor directă în transportul unor anumite substanţe (de exemplu, lizina).

Ipoteza lui Singer. În opoziţie cu alţi cercetători, Singer (1975) consideră că ipotezele prezentate nu sînt compatibile cu consideraţiile de ordin termodinamic. Deplasarea liberă a unor proteine care ,,plutesc" în mediu apos, ca şi rotaţia lor, necesită cantităţi mari de energie pentru a difuza prin regiunea hidrofobă a membranei. În plus, experienţele efectuate pe ,,vezicule" fosfolipidice sintetice arată că deplasarea moleculelor de lipide amfipatice de pe un strat pe altul (tranziţia flip-flop) se face foarte lent (în cîteva zile), ceea ce ar fi, desigur, valabil şi pentru moleculele proteice mai mari şi mai hidrofile.

După ipoteza lui Singer, lipsită însă de o bază experimentală, dar mai plauzibilă din punctul de vedere termodinamic, proteinele-purtător ar fi integrate în membrana plasmatică, a cărei structură o traversează, proeminînd la suprafeţele externă şi internă ale acesteia (fig. 14). Ele ar include o zonă mediană hidrofobă şi două zone hidrofile la extremităţi. Întrucît, de regulă, aceste proteine sînt formate din mai multe subunităţi, ele delimitează un canal sinuos, dar continuu, cu ∅ de 1,0 nm, care se formează

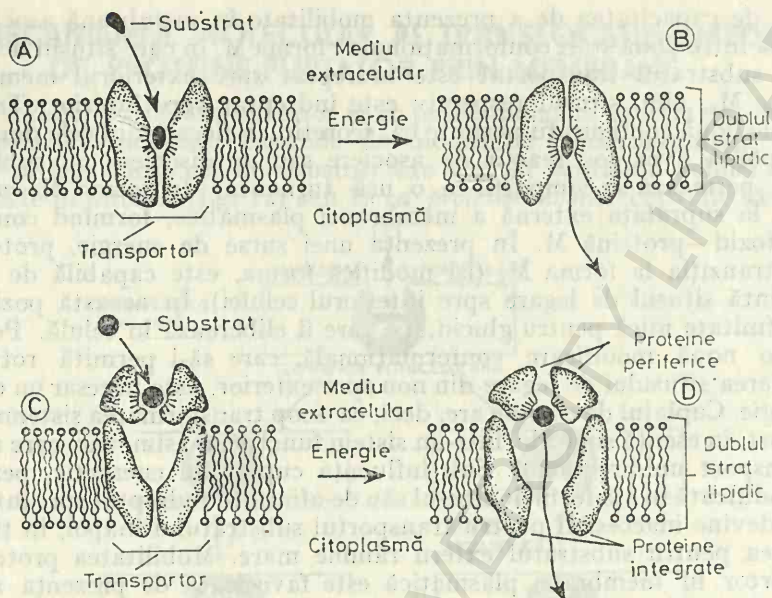


Fig. 14. — Reprezentarea schematică a mecanismului de transport cu proteine-purtător. A. Transportorul format din mai multe subunități (proteine integrate) are un sistem specific de fixare pentru molecula de transportat (substrat). B. Printr-un proces cuplat cu consum de energie structura transportorului este modificată în așa fel încît situsul de fixare, de care este atașat substratul este orientat spre citoplasmă: substratul preluat din mediul extern străbate stratul dublu lipidic al membranei plasmatice și este transportat în celulă. C. Fazele procesului de transport, în cazul unui transportor mai complex, format din subunități proteice integrate în membrană și din subunități proteice periferice, care poartă un situs specific pentru substrat (după Singer, 1975).

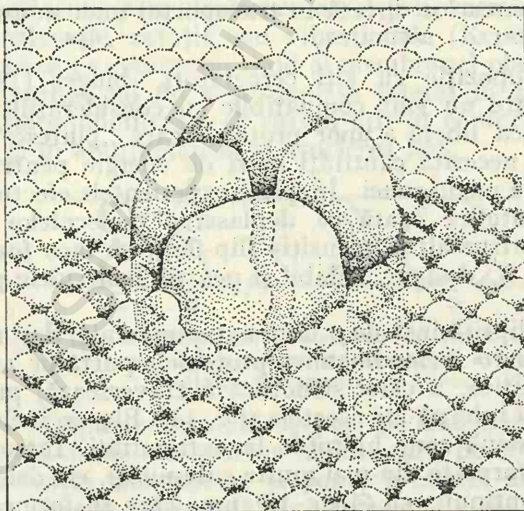


Fig. 15. — Reprezentare ipotetică a posibilității formării unui canal de transport al ionilor și moleculelor hidrofile prin membrane ca urmare a grupării a patru (sau mai multe) subunități proteice (după Singer, 1975).

aproape inevitabil cînd se asociază patru sau mai multe molecule cvasicilindrice (fig. 15). Moleculele polare sau ionii ar putea trece prin canalul proteic fie prin difuzie, fie legîndu-se de suprafaţa internă a acestuia, la nivelul unui situs activ specific, inducînd, cu sau fără consum de energie, o modificare în relaţia spaţială a subunităţilor, care le-ar forţa să treacă prin canal şi să fie eliminate de partea opusă.

PROPRIETĂŢILE SISTEMELOR DE TRANSPORT MEDIATE DE PROTEINE-PURTĂTOR

Sistemele de transport mediate de proteine-purtător au trei proprietăţi : *specificitatea, competiţia* şi *saturaţia*, care acţionînd, separat sau concertat, se comportă ca mecanisme de control, facilitînd sau oprind intrarea diferitelor molecule în celule. Datorită lor, mediul intracelular nu ajunge niciodată la un grad de suprasaturare cu o anumită moleculă, deoarece ele asigură intrarea moleculelor necesare, la un moment dat, în cantităţi corespunzătoare necesităţilor.

Specificitatea este proprietatea prin care sînt reglate natura şi rata trecerii moleculelor în şi din celulă. Ea este condiţionată de natura situsurilor de legare (de transport), care recunosc un singur tip de moleculă sau un număr limitat de substraturi cu structură chimică foarte asemănătoare (sistemele de transport ale glucozei nu pot transporta aminoacizi şi invers). În unele cazuri, situsurile de legare pot face deosebiri subtile, ca, de exemplu, cele legate de configuraţia geometrică a moleculelor, care conţin atomi şi grupări chimice identice. Spre exemplu, în cazul aceluiaşi aminoacid, forma L este transportată rapid, în timp ce forma D (imaginea lui în oglindă) numai foarte lent. În general, proteinele implicate în transportul ionilor sînt mult mai specifice decît cele care transportă compuşi organici (zaharuri, aminoacizi etc.), pentru care microorganismele au, de regulă, mai multe sisteme de transport. Astfel, *Salmonella typhimurium* are pentru histidină şase proteine de transport cu afinităţi diferite, iar *Escherichia coli* are, pe lîngă trei proteine specifice, fiecare corespunzînd unui aminoacid anumit (izoleucină, valină şi leucină), şi o proteină capabilă să-i transporte pe toţi trei. În mod similar, *Saccharomyces cerevisiae* are, pe lîngă proteine de transport strict specifice pentru arginină, lizină, metionină, histidină şi acizi dicarboxilici, şi o proteină capabilă să transporte toţi aceşti aminoacizi sau cea mai mare parte dintre ei.

Competiţia. este o proprietate care, de asemenea, afectează nu numai tipul, ci şi rata la care moleculele trec transmembranar. Deşi, de regulă, moleculele-purtător sînt specifice pentru un anumit substrat, există cazuri cînd pot transporta substanţe similare prezente concomitent în mediu. În aceste cazuri, moleculele-purtător pot prezenta grade de afinitate diferite pentru substratele respective, în aşa fel încît unul dintre ele va fi transportat preferenţial. Spre exemplu, unele sisteme de transport pot deplasa molecule similare (C_6), ca glucoza şi galactoza. Cînd mediul conţine numai glucoză, ca sursă de C şi energie, aceasta este transportată în celulă cu o rată caracteristică. Cînd este prezentă simultan şi galactoza, rata de transport a glucozei scade proporţional cu concentraţia relativă a celor două substanţe, deoarece sistemul de transport trebuie să transfere şi galactoza :

cînd glucoza predomină cantitativ, transportul său scade puțin ; cînd galactoza este în cantitate mare, transportul glucozei scade foarte mult. În ultimă instanță, acest proces reflectă competiția a două substraturi înrudite pentru același situs al moleculei de transport.

Saturația. În cursul difuziei pasive, rata de intrare a moleculelor în celulă este proporțională cu concentrația lor în zona membranei celulare. În cursul transportului activ, rata transportului este proporțională cu con-

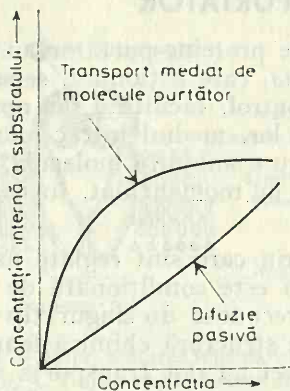


Fig. 16. — Cinetica de saturare a procesului de transport prin membrane. Transportul mediat are o rată maximă la care moleculele-purtător sînt saturate. În difuzia pasivă, transportul este, în mod obișnuit, proporțional cu concentrația și nu prezintă saturație (după Brock, 1974).

centrația substratului numai atît timp cît numărul moleculelor acestuia este mai mic decît acela al moleculelor-purtător. Există o limită dincolo de care oricît de mult substrat ar exista în mediu, rata de intrare nu mai crește (fig. 16). Acest fenomen este determinat de faptul că numărul moleculelor-purtător pentru fiecare tip de substrat este limitat, în timp ce numărul moleculelor care trebuie transportate este mult mai mare. Fenomenul de saturație marchează momentul în care toate situsurile de legare sînt ocupate și sistemul lucrează la capacitatea sa maximă : rata transportului în celulă este limitată de lipsa unor situsuri de legare disponibile.

PĂTRUNDEREA PARTICULELOR ȘI MACROMOLECULELOR ÎN CELULE. ENDOCITOZA

Multe protozoare, în special amoebe, pot îngloba particule macromoleculare și substanțe dizolvate prin intermediul unor invaginări ale membranei plasmatice. Procesul a fost descris sub denumiri diferite, în funcție de mărimea și natura substratului înglobat : fagocitoză (Metchnikoff, 1893), în cazul structurilor particulate mari (bacterii, pulberi inerte etc.), coloidopexie (Brătianu și Llombart, 1929), athrocitoză (Gerard și Cordier, 1934), ultrafagocitoză (Gosselin, 1956), pentru coloizi și coloranți acizi, și pinocitoză (Lewis, 1931), pentru înglobarea picăturilor de lichide de către macrofage. Denumirea de pinocitoză este, după Holter (1965), eronată deoarece aspectul fiziologic semnificativ al procesului nu este „băutul" (gr. = pinein), ci înglobarea substanțelor dizolvate, luate din soluție și acumularea lor pe suprafața celulei prin adsorbție (fig. 17).

Ținînd seama de mecanismul de producere al acestor procese — în esență aceleași — de Duve (1963) le-a reunit sub denumirea comună de *endocitoză* pentru cele de înglobare, respectiv de *exocitoză* pentru cele de eliminare din celule. Procesul este cel mai bine studiat la amoebe la care poate fi observat folosind particule sferice de latex de polistiren, cu ∅ de

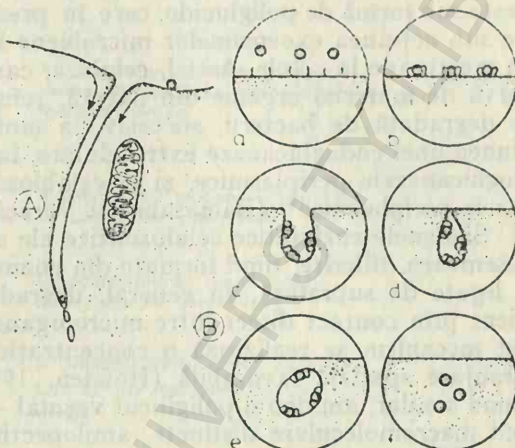


Fig. 17. — Inducția invaginării pinocitare după ipoteza lui Bennett. A. Particula adsorbită pe membrana celulară induce invaginarea, determinînd formarea unui canal, care conține particula. B. Etapele procesului de endocitoză evidențiind apropierea (a), atașarea particulelor de membrana celulară (b), invaginarea acesteia (c), formarea unei vezicule de endocitoză (d, e) și eliberarea particulelor în citoplasmă (f) (după Holter, 1965).

0,1 μm (fig. 18). El implică adsorbția prealabilă a particulei de stratul mucos, polizaharidic, care acoperă plasmalema, urmată de formarea unei mici invaginări a suprafeței acesteia, cu formarea unor canale de invaginare,

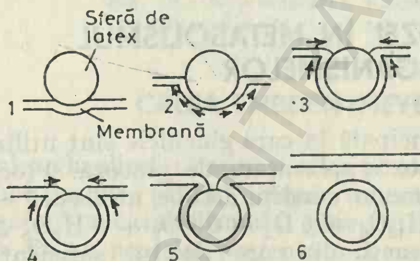


Fig. 18. — Fazele endocitozei unei microsfere de latex de polistiren, prin membrana plasmatică bacteriană. 1. Faza de adsorbție. 2. Faza de „întindere" inițială a membranei. 3, 4. Faza de formare rapidă a veziculelor. 5. Faza de formare a unei vezicule legate. 6. Eliberarea veziculei (după Rose, 1976).

cu mișcări peristaltice (Chapman-Andresen, 1963). Aceste mișcări determină formarea unor regiuni ± sferice ca niște mărgele, de-a lungul canalului, care sînt translocate spre capătul acestuia unde sînt eliberate printr-un proces de strangulare. Prin acest mecanism, veziculele și conținutul lor trec în celulă unde sînt digerate de enzimele intracelulare.

Nu se cunoaște natura modificărilor membranei în acest proces. Unele observații, și în special viteza cu care se produce endocitoza, pledează mai degrabă pentru „întinderea" ei decît pentru creștere și alungire în timpul formării invaginărilor. De asemenea, nu se cunosc mecanismele moleculare ale acestui proces, care este, în orice caz, un proces relativ nespecific, în raport cu transportul activ mediat de molecule-purtător.

METABOLISMUL GLUCIDELOR LA MICROORGANISME

Numeroase microorganisme utilizează glucidele ca sursă de energie și de C celular pe calea unor secvențe metabolice de catabolism și biosinteză, care uneori variază de la o specie la alta, astfel încît nu pot fi prezentate într-o schemă unitară. Cea mai mare parte a rezervei de C din natură se găsește sub formă de poliglucide, care în prealabil suferă un proces de degradare sub acțiunea exoenzimelor microbiene la molecule mici, transportabile prin membrane în celule. Astfel, celuloza, care formează cea mai abundentă rezervă de material organic din natură, reînnoibilă anual prin fotosinteză, este degradată de bacterii, succesiv, la molecule oligoglucidice lungi, sub acțiunea unei endoglucanaze extracelulare, la oligoglucide scurte, de către endoglucanazele periplasmice, și la celobioză și glucoză, de către β-glucozidazele periplasmice*) (Ramasamy și Verachtert, 1980).

Sistemele enzimatice celulozolitice ale diferitelor microorganisme sînt, de asemenea, diferite, fiind formate din enzime extracelulare și intracelulare sau legate de suprafață. În general, degradarea celulozei are loc cel mai eficient prin contact direct între microorganisme și substrat, deoarece prin acest mecanism se realizează o concentrație enzimatică locală maximă și o aranjare spațială favorabilă (Hofsten, 1975; Tor-Magnus Enari, 1983). În mod similar, amidonul poliglucid vegetal — format prin asocierea a două specii macromoleculare distincte, amilopectina (component major formînd ~ 80%) și amiloza — este degradat sub acțiunea α-amilazei (la *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* etc.) și de glucoamilaze, enzime exclusiv microbiene (prezente la *Aspergillus*, *Rhizopus*, levuri și bacterii), la moleculele monomere componente de D-glucoză.

UTILIZAREA GLUCOZEI ÎN METABOLISMUL MICROORGANISMELOR

În ultimă instanță, forma principală în care glucidele sînt utilizate în metabolismul microorganismelor este reprezentată de glucoză. Procesul a fost studiat în detaliu la *E. coli*, care în condiții aerobe utilizează ~ 50% din substrat, oxidîndu-l la CO_2($C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$; $\Delta G_0' = - 686$ kcal) printr-o serie de reacții din care rezultă suficient ATP pentru a asigura conversia restului de substrat (~ 50%) în material celular. Fig. 19 prezintă ansamblul reacțiilor care asigură la *E. coli* oxidarea glucozei la CO_2 și H_2O, cu conservarea unei părți din energia eliberată sub formă de ATP.

Pînă în prezent au fost descrise patru căi principale diferite: 1) calea Embden—Meyerhof—Parnas; 2) calea hexozomonofosfatului; 3) calea Entner—Doudoroff și 4) calea fosfocetolazei. Primele două sînt funcționale deopotrivă în celulele animalelor superioare, ca și la bacterii și fungi, în timp ce ultimele două sînt folosite în exclusivitate de bacterii. Deși transformările chimice efectuate în reacțiile acestor căi la diferite microorganisme

*) Degradarea microbiană a celulozei va fi prezentată în detaliu în vol. IV.

sînt aceleași, sistemele enzimatice efectoare active la un microorganism dat sînt, adesea, întrucîtva diferite de cele care acționează la alte microorganisme. În toate aceste căi, piruvatul ocupă poziția unui intermediar-cheie, deoarece este situat la punctul de intersecție metabolică de la care pornesc diferitele căi terminale.

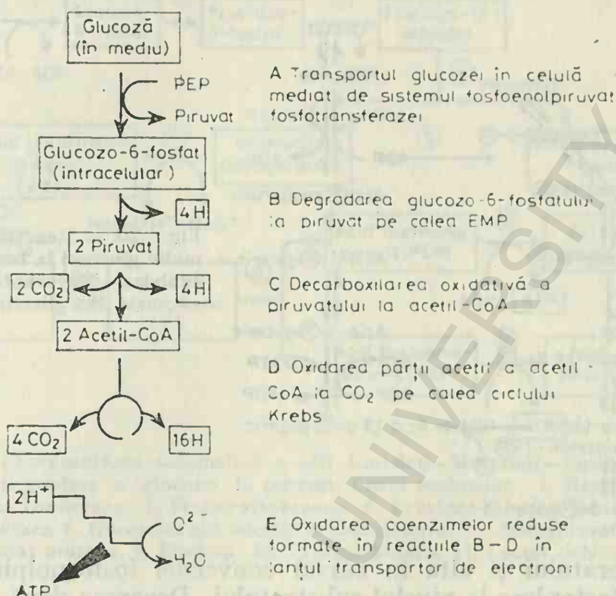


Fig. 19. — Reprezentarea schematică a etapelor oxidării glucozei la CO_2, la *E. coli* (după Gottschalk, 1979).

CALEA EMBDEN–MEYERHOF–PARNAS

Calea glicolizei, numită și calea hexozodifosfatului sau calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), după numele descoperitorilor săi, reprezintă calea majoră a catabolismului glucozei la cele mai multe microorganisme (fig. 20). Ea nu necesită prezența oxigenului, fiind o cale integral anaerobă, care cuprinde o secvență de 10 reacții enzimatice prin care o moleculă de glucoză este degradată la două molecule de piruvat, fără intervenția O_2 molecular.

Inițial, glucoza este fosforilată, cu formare de glucozo-6-fosfat, fie în cursul procesului de transport transmembranar, prin intervenția sistemului enzimatic al fosfotransferazelor dependent de PEP, fie intracelular, de către o kinază citoplasmatică, cu consum de ATP. Ulterior, glucozo-6-fosfatul este convertit la fructozo-6-fosfat, iar acesta, în prezența ATP la fructozo-1,6-difosfat. Reacția caracteristică a căii EMP este scindarea fructozo-1,6-difosfatului (care explică denumirea de calea hexozodifosfatului folosită adesea), sub acțiunea aldolazei, pentru a produce un amestec de triozofosfați (aldehidă 3-fosfoglicerică și dihidroxiaceton-1-fosfat), care sînt interconvertiți și menținuți în echilibru de o triozoizomerază. Oxidarea triozofosfa-

ţilor cuplată cu reducerea NAD^+ are ca urmare producerea a două molecule de acid 1,3-difosfogliceric, care final sînt convertite printr-o serie de reacţii la piruvat.

În cursul acestor reacţii se formează 4 molecule de ATP, respectiv cîte două din fiecare moleculă de triozofosfat : una în cursul defosforilării

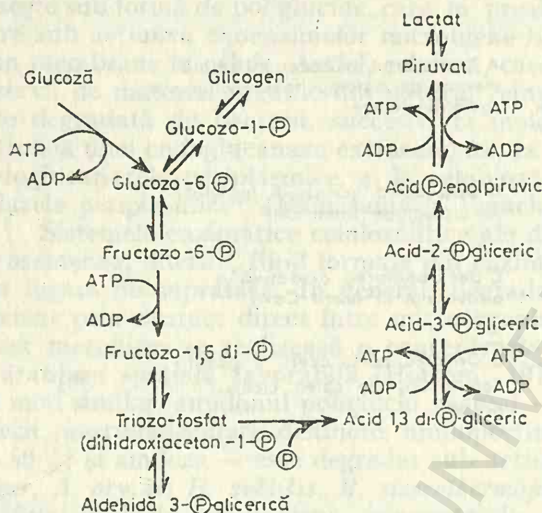
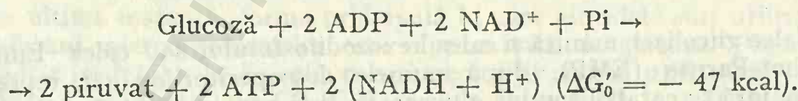


Fig. 20. — Reacţiile catabolismului glucozei la bacterii pe calea Embden—Meyerhof—Parnas (calea glicolizei).

1,3-difosfogliceratului şi alta în cursul conversiei fosfoenolpiruvatului la piruvat, prin fosforilare la nivelul substratului. Deoarece două molecule de ATP sînt consumate pentru a „pregăti" glucoza în vederea transformării ei la fructozo-1,6-difosfat, cîştigul global al conversiei unei molecule de glucoză la două molecule de piruvat este de două molecule de ATP.

Reacţia globală a căii EMP este :



$$\text{Glucoză} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{NAD}^+ + \text{Pi} \rightarrow$$

$$\rightarrow 2\ \text{piruvat} + 2\ \text{ATP} + 2\ (\text{NADH} + \text{H}^+)\ \ (\Delta G_0' = -\ 47\ \text{kcal}).$$

Din aceasta rezultă că în cursul reacţiilor numai 25% din energia eliberată de la glucoză este conservată în legături macroergice, restul fiind pierdută sub formă de căldură.

Calea EMP este utilizată de către bacteriile care produc fermentaţiile homolactică, propionică, butirică, acetonobutilică, de numeroase enterobacterii şi de levuri în cursul fermentaţiei alcoolice. Deşi, în esenţă, ea are aceeaşi evoluţie la toate microorganismele (fig. 21), proprietăţile anumitor enzime nu sînt uniforme.

Microorganismele care folosesc în exclusivitate această cale nu se dezvoltă pe medii de cultură simple (glucoză + săruri minerale) şi au nevoie de factori de creştere. Spre deosebire de celulele animale, în care glucoza este convertită anaerob la acid lactic ca produs final, via piruvat, la microorganisme acest mod de evoluţie este întîlnit numai în cazul bacteriilor

lactice homofermentative. Celelalte microorganisme utilizează această cale pînă la piruvat, al cărui metabolism ulterior variază de la un grup de bacterii la altul. În plus, calea EMP este urmată nu numai de bacteriile anaerobe și, ca urmare, la bacterii ea nu este obligatoriu o cale anaerobă de utili-

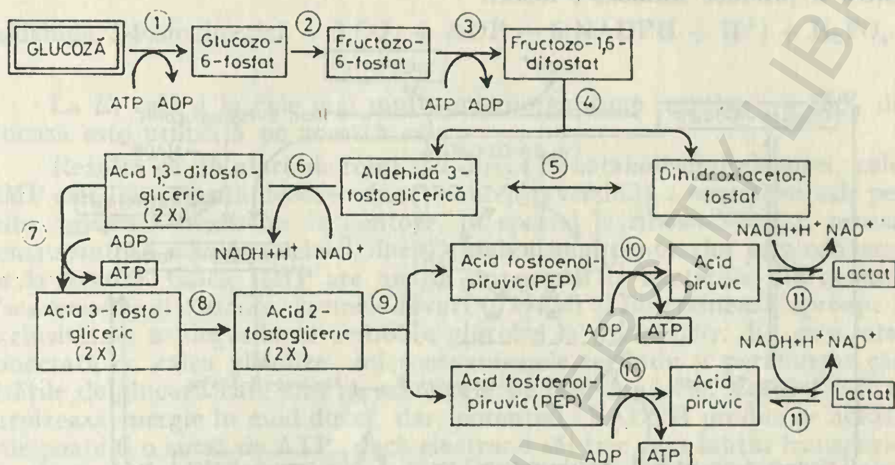


Fig. 21. — Reprezentarea schematică a căii Embden—Meyerhof—Parnas (calea glicolizei), de degradare a glucozei la piruvat. Cheia enzimelor: 1. Hexokinaza. 2. Glucozo-6-fosfat izomeraza. 3. Fosfofructokinaza. 4. Fructozo-difosfat aldolaza. 5. Triozofosfat izomeraza. 6. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. 7. 3-fosfoglicerat kinaza. 8. Fosfoglicerat mutaza. 9. Enolaza. 10. Piruvat kinaza. 11. Lactat dehidrogenaza.

zare a glucozei. Aceasta explică schimbarea semnificației termenului de glicoliză, care în forma sa originară era utilizat pentru a caracteriza numai procesele de fermentație anaerobă, prin care se formează acid lactic sau etanol și CO_2. În prezent, el are o semnificație mai generală, fiind utilizat pentru a descrie procesul de degradare a glucidelor via glucozo-6-fosfat, fructozo-difosfat și piruvat, atît în prezența, cît și în absența oxigenului (Metzler, 1977).

CALEA HEXOZOMONOFOSFATULUI

Calea glicolizei (EMP) este calea majoră de degradare a glucozei la cele mai multe microorganisme, ca și la celulele animale și vegetale. Ea nu explică însă modul în care pot fi folosite pentozele ca sursă de energie și nici formarea ribozei, necesară pentru biosinteza acizilor nucleici. Calea hexozomonofosfatului (HMP), numită și calea pentozofosfatului, calea fosfogluconatului sau calea Warburg—Dickens—Horecker, care funcționează la unele microorganisme pentru utilizarea hexozelor, pentozelor și altor glucide este practic o cale de „ocolire" a căii EMP, de unde și denumirea de „Shuntul HMP".

Calea HMP are două etape principale, prima asigurînd utilizarea hexozelor și formarea de ribulozo-5-fosfat (calea oxidativă) și a doua de conversie a pentozofosfaților la hexozofosfat (calea neoxidativă), (fig. 22).

Reacțiile inițiale constau în oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat, cu eliberare de NADPH și CO_2, după secvența glucozo-6-fosfat → 6-fosfatgluconolactonă → acid 6-fosfogluconic → ribulozo-5-fosfat. Ulterior, ribulozo-5-fosfat este izomerizat pentru a produce ribozo-5-fosfat sau epimerizat pentru a produce xilulozo-5-fosfat.

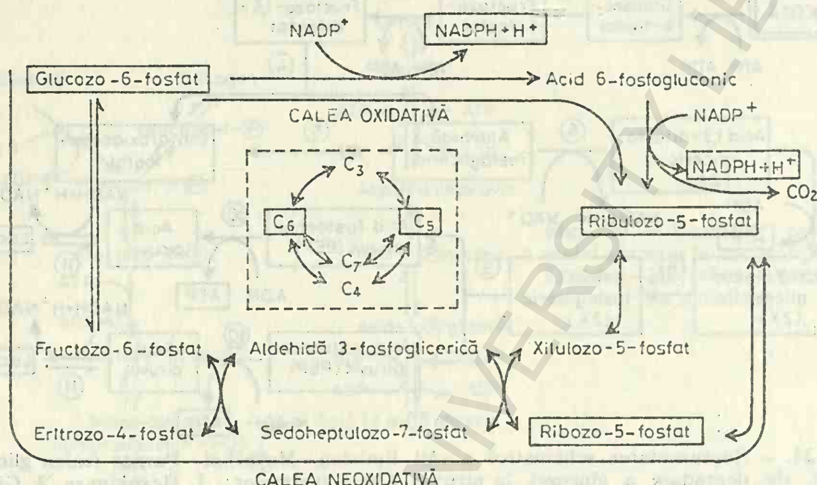
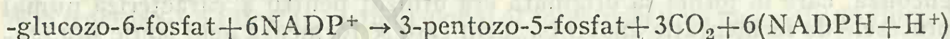


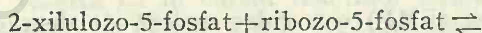
Fig. 22. — Reacțiile shunt-ului hexozomonofosfatului: oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat și conversia pentozofosfaților la hexozofosfați. În centru, schema interconversiunii glucidelor.

Suma reacțiilor este:



-glucozo-6-fosfat$+$6NADP$^+$ → 3-pentozo-5-fosfat$+$3$CO_2$$+$6(NADPH$+H^+$)

Această situație este valabilă la *E. coli* dacă nevoia de NADPH și de pentozofosfat este în raport de 2 : 1. În cazurile în care este nevoie de mai mult NADPH pentru fiecare pentozofosfat produs, excesul de pentozofosfat este îndepărtat prin acțiunea enzimelor, *transcetolază* și *transaldolază*, caracteristice căii HMP. Ele fac conversia pentozofosfaților la fructozo-6-fosfat și aldehidă 3-fosfoglicerică, după reacția:



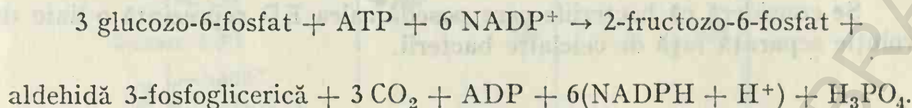
2-xilulozo-5-fosfat$+$ribozo-5-fosfat $\rightleftharpoons$



2-fructozo-6-fosfat $+$ aldehidă 3-fosfoglicerică

În aceste reacții, transcetolaza transferă un fragment cu doi atomi de C de la xiluloză la ribozo-5-fosfat, determinînd formarea unui monoglucid cu 7 C(sedoheptulozo-7-fosfat) și a unui compus C_3, aldehida 3-fosfoglicerică. Transaldolaza transferă un fragment cu trei atomi de C de la sedoheptuloză la aldehida 3-fosfoglicerică, pentru a forma fructozo-6-fosfat și eritrozo-4-fosfat. Deoarece reacțiile acestea sînt reversibile, atunci cînd formarea de NADPH pe calea oxidativă a ciclului nu este dorită, are loc reacția de sinteză a pentozofosfaților de la hexozomonofosfați.

Reacția globală a căii HMP este următoarea:



$$3 \text{ glucozo-6-fosfat} + ATP + 6\ NADP^{+} \rightarrow 2\text{-fructozo-6-fosfat} +$$

$$\text{aldehidă 3-fosfoglicerică} + 3\ CO_2 + ADP + 6(NADPH + H^{+}) + H_3PO_4.$$

La *E. coli* și la cele mai multe microorganisme aerobe, ~28% din glucoză este utilizată pe această cale.

Rezultă că, în afară de rolul său direct în catabolismul glucozei, calea HMP este importantă deoarece funcționarea reversibilă a enzimelor sale permite conversia hexozelor la pentoze, în special la ribozo-5-fosfat, necesar pentru sinteza acizilor nucleici, dar și catabolismul pentozelor prin conversia lor la hexoze. Calea HMP are un rol important la bacteriile din genurile *Pseudomonas* și *Sarcina*, la unele levuri (*Torula*) și funcționează aproape în exclusivitate în degradarea aerobă a glucozei la *Acetobacter*. Ea este interconectată cu calea glicolizei, microorganismele reglîndu-și permanent cantitățile de glucoză care sînt metabolizate pe cele două căi. Calea HMP nu furnizează energie în mod direct, dar, potențial, NADPH produs pe această cale poate fi o sursă de ATP, dacă electronii săi trec prin lanțul transportor de electroni la oxigen. Enzimele căii HMP participă în ciclul lui Calvin și în biosinteza glucidelor de către microorganismele fototrofe și chemolitotrofe. De asemenea, ea este implicată într-o măsură importantă în metabolismul biosintetic, deoarece furnizează celulei metaboliți pentru biosinteza amioacizilor aromatici de la eritrozo-4-fosfat, precum și pentru unele vitamine.

CALEA ENTNER—DOUDOROFF

Pe lîngă calea EMP, calea Entner—Doudoroff (ED), descoperită la *Pseudomonas saccharophila* și *Zymomonas mobilis (Pseudomonas lindneri)* reprezintă o a treia cale importantă pentru degradarea glucidelor, prezentă în natură numai la bacterii și la unii viermi paraziți, ceea ce demonstrează că nu s-a păstrat de-a lungul evoluției organismelor.

Și în acest caz, primul intermediar este glucozo-6-fosfatul, care este oxidat în același mod ca în calea HMP la 6-fosfogluconat. Ulterior, printr-o reacție de dehidrogenare, acesta formează un compus intermediar caracteristic, 2-ceto-3-dezoxi-6-fosfogluconat (CDPG). În ultima etapă, CDPG este scindat, printr-o reacție catalizată de aldolază, la piruvat și aldehidă 3-fosfoglicerică (fig. 23). Aldehida 3-fosfoglicerică poate utiliza enzimele căii EMP, în care caz se formează piruvat și, totodată, 2 moli de ATP și un mol de NADH (per mol de triozofosfat), sau pe cele ale căii HMP; în acest ultim caz, calea furnizează precursori importanți pentru biosinteza de ADN, ARN, vitamine și acizi aromatici, fără producere de energie. Enzimele-cheie ale căii ED sînt 2,6-fosfogluconat dehidrogenaza și 2-ceto-3-dezoxifosfogluconat aldolază. Ele sînt prezente, în general, la bacteriile din genurile *Pseudomonas*, *Rhizobium* și la alte bacterii Gram-negative.

Sînt totdeauna absente la bacteriile Gram-pozitive, cu excepția unora din genul *Nocardia*.

Se consideră că bacteriile care posedă calea ED reprezintă o linie de evoluție separată față de celelalte bacterii.

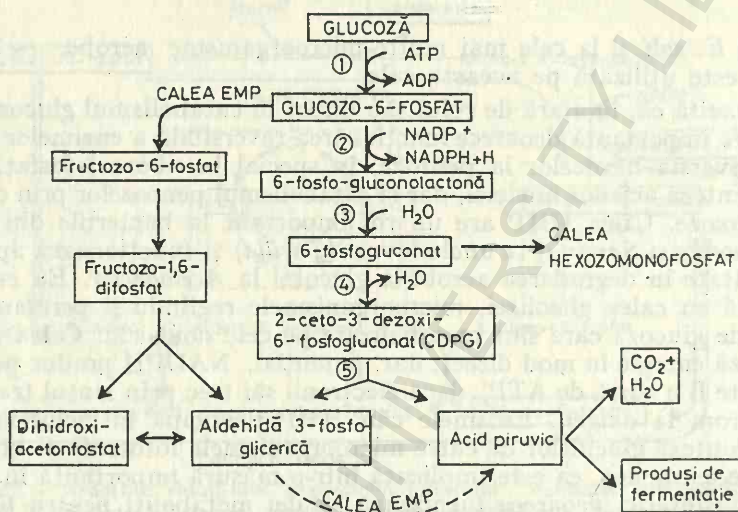


Fig. 23. — Reacțiile căii Entner—Doudoroff (calea cetodezoxifosfogluconatului). Cheia enzimelor: 1. Hexokinaza. 2. Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza. 3. 6-fosfogluconolactonaza. 4. 2,6-fosfogluconat dehidrogenaza. 5. 2-ceto-3-dezoxifosfogluconat aldolaza.

CALEA FOSFOCETOLAZEI

Descrisă inițial la *Leuconostoc mesenteroides*, calea fosfocetolazei este prezentă numai la grupul limitat al bacteriilor lactice heterofermentative. Ea apare ca o variantă a căii HMP, cu care are primele trei reacții în comun (fig. 24) ce duc la formarea de ribulozo-5-fosfat, via glucozo-6-fosfat, gluconolactono-6-fosfat, 6-fosfogluconat. Ulterior, ribulozo-5-fosfatul este izomerizat la xilulozo-5-fosfat, care este clivat de enzima caracteristică a căii—*fosfocetolaza* — la aldehidă 3-fosfoglicerică (metabolizată în continuare pe calea EMP la piruvat și final la lactat) și la acetilfosfat. Acest compus macroergic poate fi convertit la acetat cu conservarea legăturii macroergice sub formă de ATP sau metabolizat în continuare pînă la etanol.

Eficiența energetică a acestei căi este mică: dacă acetilfosfatul este convertit la etanol (ca la *L. mesenteroides*) cîștigul net de energie este de 1 mol ATP/mol de glucoză catabolizată. Cînd acetilfosfatul este convertit ca la *Bifidobacterium bifidum* rezultă un cîștig net de 2 ATP.

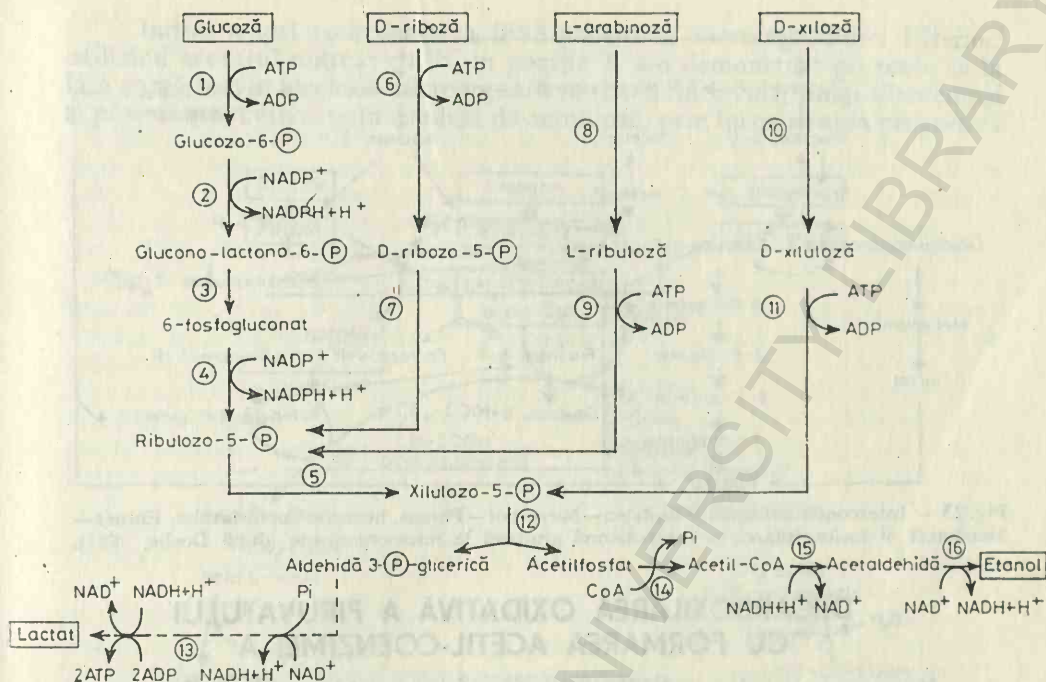


Fig. 24. — Calea fosfocetolazei, de utilizare a hexozelor și pentozelor de către bacteriile lactice heterofermentative. Cheia enzimelor: 1. Hexokinaza. 2. Glucozo-6-P-dehidrogenaza. 3. Gluconolactonaza. 4. Fosfogluconat dehidrogenaza. 5. Ribulozofosfat-3-epimeraza. 6. Ribokinaza. 7. Ribozofosfat izomeraza. 8. Arabinoz-izomeraza. 9. Ribulokinaza. 10. Xiloz-izomeraza 11. Xilokinaza. 12. Fosfocetolaza. 13. Intră în calea glicolizei. 14. Fosfotranscetolaza. 15. Acetaldehid dehidrogenaza. 16. Alcool dehidrogenaza.

INTERCONEXIUNILE CĂILOR CATABOLISMULUI GLUCOZEI

Cele patru căi ale metabolismului glucidelor sînt strîns interconectate, datorită faptului că au un număr important de compuși intermediari și enzime în comun, în afara enzimelor-cheie, care sînt specifice și determină caracterul particular al fiecărei căi în parte. Cu excepția căii fosfocetolazei, care este limitată la un număr mic de bacterii, celelalte trei căi (EMP, HMP și ED) pot fi folosite alternativ sau în diferite combinații în funcție de anumite necesități ale metabolismului (fig. 25).

Calea EMP reprezintă calea majoră a eliberării de energie (ATP) și este folosită, în special, de microorganismele care cresc pe medii complexe (bulion de carne, extract de levuri), care le satisfac nevoile de purine, pirimidine, pentoze pentru sinteza de ADN și de ARN. Calea HMP care eliberează, comparativ cu cea anterioară, numai 1/2 din cantitatea de ATP, are în schimb avantajul că asigură producerea precursorilor ADN și ARN. Calea ED, preferată de microorganismele strict aerobe, parțial legată de HMP, poate funcționa și independent de celelalte două, datorită capacității sale de a forma direct piruvat.

Fig. 25 — Interconexiunile căilor Embden—Meyerhof—Parnas, hexozomonofosfatului, Entner—Doudoroff și fosfocetolazei în catabolismul glucozei la microorganisme (după Doelle, 1981).

DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A PIRUVATULUI CU FORMAREA ACETIL-COENZIMEI A

Microorganismele aerobe au proprietatea de a oxida enzimatic piruvatul format în calea glicolitică, cu formarea unui compus cu 2 C, acetil-CoA.

La *E. coli*, reacția este catalizată de complexul piruvat dehidrogenazei format din trei enzime: 24 molecule de piruvat dehidrogenază (E_1), 24 molecule de transacetilază dihidrolipoică (E_2) și 12 molecule de dehidrogenază dihidrolipoică (E_3), după reacția globală:

$$H_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + HS-CoA + NAD^+ \rightarrow CH_3-CO\sim SCoA + CO_2 + NADH + H^+$$

Prin acțiunea combinată a enzimelor căii glicolitice (EMP) și a complexului piruvat dehidrogenazei, microorganismele aerobe realizează degradarea glucozei la CO_2 și acetil-CoA, după ecuația:

$$\text{Glucoză} + 2\,ADP + 4\,NAD^+ \xrightarrow{2\,Pi:\,2\,HS-CoA} 2\,\text{acetil-CoA} + 2\,CO_2 + 2\,ATP + 4(NADH + H^+)$$

Acetil-CoA este forma activată a acetatului, reprezentînd un intermediar-cheie în ciclul acizilor tricarboxilici și avînd un rol important în multe procese de biosinteză.

CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI

Ciclul acizilor tricarboxilici (ATC), numit și ciclul acidului citric sau ciclul Krebs, reprezintă calea de oxidare completă, aerobă, a glucozei, respectiv a acetatului, provenit nu numai din glicoliză, ci și din β-oxidarea acizilor grași, sau a unor aminoacizi.

Inițial a fost considerat ca fiind absent la microorganisme. Ulterior, utilizînd acetatul marcat cu ^{14}C în poziția 2, s-a demonstrat prezența sa la la o gamă foarte largă de microorganisme (bacterii, levuri, fungi filamentoși și protozoare) cultivate în condiții de aerobioză, prin încorporarea progresivă

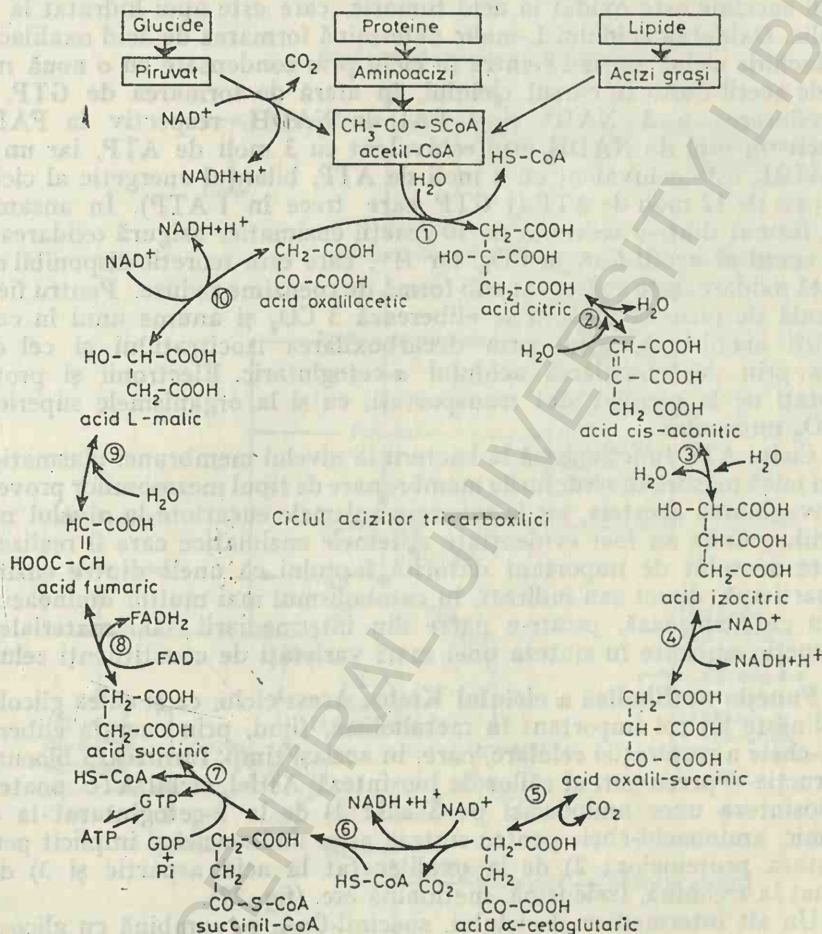


Fig. 26. — Reacțiile ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs). Cheia enzimelor: 1. Enzma de condensare (aldolizare în prezența citrat sintetazei). 2, 3. Aconitaza. 4. Izocituat dehidrogenaza. 5. Oxalilsuccinat dehidrogenaza. 6. α-cetoglutarat decarboxilaza. 7. Succinil-CoA sintetaza. 8. Succinat dehidrogenaza. 9. Fumaraza. 10. Malat dehidrogenaza.

a C radioactiv în metaboliții intermediari formați de la acetat. Cercetările efectuate pe *E. coli* și *Micrococcus lysodeikticus* au demonstrat că la aceste bacterii ciclul ATC asigură oxidarea a cel puțin 90% din acetat.

Ciclul Krebs (fig. 26) are ca punct de plecare acetil-CoA, care se condensează cu oxalilacetatul în prezența citrat sintetazei pentru a forma acid citric, izomerizat mai departe la acid izocitric, via acid cisaconitic. Datorită

prezenței caracteristice a acestor primi trei compuși tricarboxilici, ciclul Krebs este denumit ciclul acizilor tricarboxilici. În continuare, acidul izocitric este oxidat și decarboxilat la acid α-cetoglutaric, care prin decarboxilare oxidativă în prezența CoA, trece în succinil-CoA. Clivarea succinil-CoA la acid succinic determină producerea unei legături macroergice (GTP). Acidul succinic este oxidat la acid fumaric, care este apoi hidratat la acid L-malic. Oxidarea acidului L-malic determină formarea de acid oxalilacetic, care închide ciclul, putînd reintra în ciclu prin condensare cu o nouă moleculă de acetil-CoA. În cursul ciclului, în afară de formarea de GTP, are loc reducerea a 3 NAD^+ și 1 FAD la NADH, respectiv la $FADH_2$. Întrucît un mol de NADH este echivalent cu 3 moli de ATP, iar un mol de $FADH_2$ este echivalent cu 2 moli de ATP, bilanțul energetic al ciclului ATC este de 12 moli de ATP (1 GTP care trece în 1 ATP). În ansamblu, ciclul format dintr-o secvență de 10 reacții enzimatice asigură oxidarea restului acetil al acetil-CoA la CO_2, iar H^+, care este teoretic disponibil după această oxidare, este conservat sub formă de coenzime reduse. Pentru fiecare moleculă de piruvat folosită se eliberează 3 CO_2 și anume unul în cursul formării acetil-CoA, altul prin decarboxilarea izocitratului și cel de-al treilea prin decarboxilarea acidului α-cetoglutaric. Electronii și protonii acceptați de la piruvat sînt transportați, ca și la organismele superioare, spre O_2 molecular.

Ciclul ATC funcționează la bacterii la nivelul membranei plasmatice și în mai mică măsură în structurile membranare de tipul mezosomilor provenite din invaginarea acesteia, iar la microorganismele eucariote la nivelul mitocondriilor, unde au fost evidențiate sistemele enzimatice care îl realizează. El este deosebit de important datorită faptului că unele dintre enzimele sale participă, direct sau indirect, în catabolismul mai multor aminoacizi și pentru că furnizează, printr-o parte din intermediarii săi, materiale de construcție utilizate în sinteza unei mari varietăți de constituenți celulari.

Funcția amfibolică a ciclului Krebs. Acest ciclu, ca și calea glicolizei, îndeplinește un rol important în metabolism, fiind, prin energia eliberată, o cale-cheie a respirației celulare, care, în același timp, furnizează blocuri de construcție— precursori ai căilor de biosinteză. Astfel, ciclul ATC poate iniția biosinteza unor aminoacizi pe 3 căi: 1) de la α-cetoglutarat la acid glutamic, aminoacid-cheie pentru sinteza altor aminoacizi și implicit pentru biosinteza proteinelor; 2) de la oxalilacetat la acid aspartic și 3) de la succinat la treonină, izoleucină, metionină etc. (fig. 27).

Un alt intermediar al ciclului, succinil-CoA, se combină cu glicocolul pentru a forma nucleul pirol, component important pentru structura citocromilor și a clorofilei, iar acetil-CoA este utilizată pentru biosinteza acizilor grași.

Capacitatea căii glicolizei și a ciclului ATC de a produce energie și de a furniza precursori pentru biosinteze este numită funcție amfibolică.

Reacțiile anaplerotice ale ciclului Krebs. Deoarece reacțiile producătoare de energie și cele de furnizare a precursorilor pentru biosinteze au loc simultan, există o pierdere continuă de acizi dicarboxilici cu 4 și 5 C, care intră în căile biosintetice celulare. Dacă intermediarii ciclului sînt consumați pentru biosinteze, funcția respiratorie poate deveni vulnerabilă prin scăderea producerii de energie. Această pierdere de intermediari poate continua

numai dacă deficitul rezultat este compensat prin aportul altor căi metabolice. Reacţiile care asigură completarea acestui deficit şi reaprovizionarea ciclului ATC cu intermediari au fost denumite, de Kornberg (1966), *reacţii anaplerotice* („filling-up", „replenishing reactions"), (fig. 28).

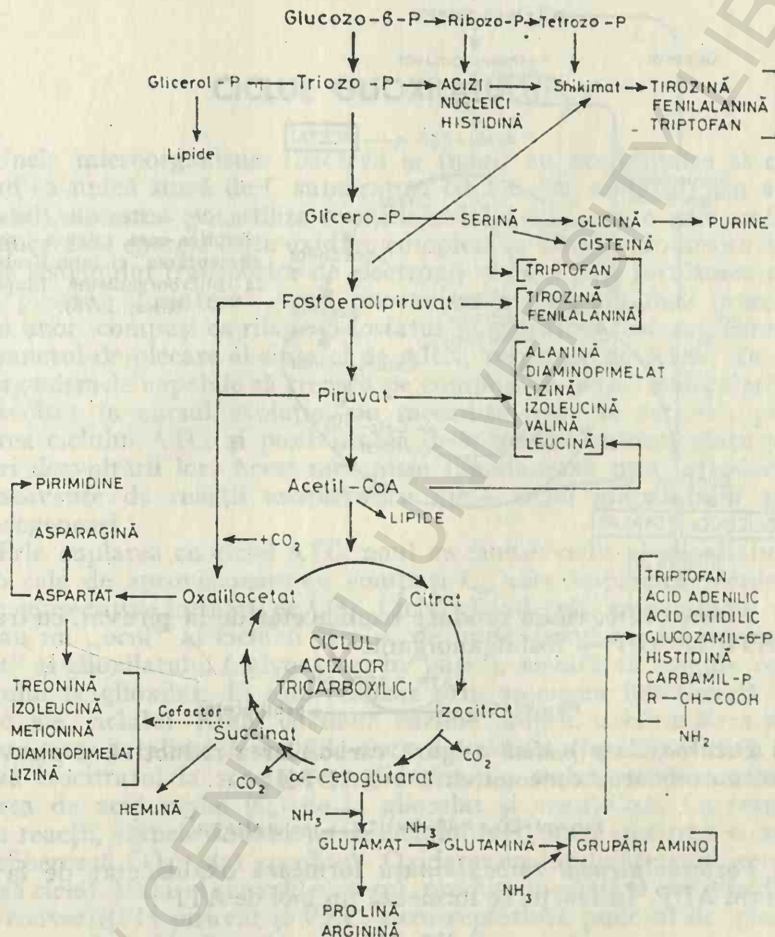


Fig. 27. — Natura amfibolică a căii Embden—Meyerhof—Parnas şi a ciclului acizilor tricarboxilici.

Teoretic, ciclul ATC poate funcţiona utilizînd o moleculă de oxalilacetat, cu condiţia ca această moleculă să fie continuu regenerată. De aceea, microorganismele au dezvoltat în cursul evoluţiei mai multe mecanisme enzimatice, care pot asigura „reaprovizionarea" cu intermediari ai ciclului ATC, făcînd ca în condiţii normale reacţiile prin care aceştia sînt formaţi şi utilizaţi să fie echilibrate.

Bacteriile ca grup dispun de cinci enzime, respectiv de cinci căi posibile de acest fel, dintre care două își au originea la piruvat, iar celelalte la fosfoenolpiruvat (PEP). Ele funcționează după reacțiile următoare:

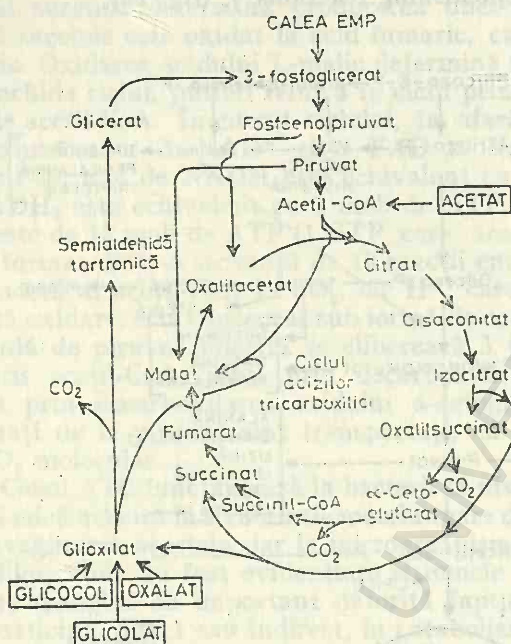
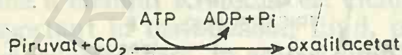
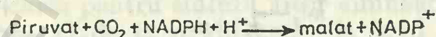


Fig. 28. — Reacțiile anaplerotice care asigură „realimentarea" ciclului Krebs la microorganisme (după Rose, 1976).

1) *Piruvat carboxilaza* produce oxalilacetat de la piruvat, cu transformarea ATP la ADP + fosfat anorganic:



2) *Decarboxilaza malică* asigură carboxilarea reductivă a piruvatului la malat, cu oxidarea concomitentă a NADPH:



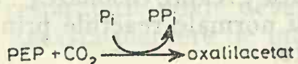
3) *Fosfoenolpiruvat carboxikinaza* formează oxalilacetat de la PEP, cu ajutorul ADP. În reacție se formează un mol de ATP:



4) *Fosfoenolpiruvat carboxilaza* catalizează formarea de oxalilacetat după reacția:



5) *Fosfoenolpiruvat carboxitransfosforilaza* efectuează o reacție similară celei a PEP-carboxikinazei, care necesită CO_2, și determină conversa fosfatului anorganic la pirofosfat (PP_i):



Prima reacţie reprezintă calea anaplerotică principală la *E. coli* şi la *Enterobacteriaceae*, în general. Reacţiile anaplerotice catalizate de piruvat carboxilază au fost semnalate ca deosebit de active la levuri. Reglarea activităţii acestor enzime şi a reacţiilor produse de ele este foarte complexă şi incomplet studiată, fiind variabile în funcţie de natura microorganismelor şi a substraturilor utilizate.

CICLUL GLIOXILATULUI

Unele microorganisme (bacterii şi fungi) au posibilitatea să crească utilizînd ca unică sursă de C substraturi cu 2 C (ca acetatul) sau 4 C (ca succinatul). Acestea pot utiliza reacţiile ciclului ATC, ca o cale amfibolică de producere de energie (prin oxidare completă la CO_2 şi producere de ATP pe calea sistemului transportor de electroni) şi / sau prin furnizarea de precursori pentru biosinteze. Acest mecanism nu asigură însă prezenţa în celulă a unor compuşi ca ribozo-5-fosfatul şi eritrozo-4-fosfatul, care reprezintă punctul de plecare al sintezei de ARN, respectiv de ADN. De aceea, microorganismele capabile să crească pe compuşi cu masă moleculară mică au dezvoltat în cursul evoluţiei un mecanism care le permite, pe lîngă utilizarea ciclului ATC, şi posibilitatea de a forma pentozofosfaţii absolut necesari dezvoltării lor. Acest mecanism funcţionează prin introducerea a două secvenţe de reacţii anaplerotice noi — ciclul glioxilatului şi calea gluconeogenezei.

Prin cuplarea cu ciclul ATC, noul mecanism ciclic al glioxilatului asigură o cale de aprovizionare cu compuşi C_4, care împiedică pierderile de carbon consecutive formării de CO_2. Ciclul glioxilatului reprezintă o modificare sau un „ocol" al ciclului Krebs, de unde derivă şi denumirea sa de „shunt" al glioxilatului („glyoxylate by pass"), menită să asigure oxidarea acetatului la glioxilat. El este realizat prin asocierea funcţională a cinci enzime ale ciclului Krebs cu două enzime proprii, *izocitrat liaza* şi *malat sintetaza*, care catalizează reacţiile-cheie ale ciclului (fig. 29). Prima enzimă cliveazā izocitratul la succinat şi glioxilat, iar malat sintetaza catalizează formarea de acid malic (C_4) de la glioxilat şi acetil-CoA. Ca rezultat al acestor reacţii, etapele de oxidare ale ciclului ATC, între izocitrat şi succinat (care eliberează CO_2), sînt „ocolite". Oxidarea malatului la oxalilacetat completează ciclul. Malatul şi oxalilacetatul, produşi imediaţi ai căii glioxilatului, pot fi convertiţi la piruvat şi PEP, care reprezintă punctul de plecare al al unor reacţii de biosinteză a unor compuşi esenţiali.

La bacterii, ciclul ATC şi cel al glioxilatului nu sînt separate spaţial. Genele care codifică enzimele specifice acestei căi sînt grupate împreună pe cromosom. Calea glioxilatului oferă un exemplu de „economie" şi de ilustrare a principiului optimalităţii, deoarece microorganismele pot folosi atît glucidele, cît şi compuşi simpli (2 C), utilizînd mai multe enzime comune, recurgînd la un număr limitat de reacţii noi.

Deşi ciclul ATC şi cel al glioxilatului au anumiţi intermediari comuni, funcţiile lor sînt foarte diferite : ciclul ATC asigură catabolismul acetatului cu eliberare de energie, în timp ce ciclul glioxilatului are funcţii exclusiv asimilatoare, contribuind la sinteza acizilor dicarboxilici. El a fost eviden-

țiat la multe bacterii și mucegaiuri, dar nu a fost găsit niciodată la animalele superioare, care nu sînt obligate să se hrănească exclusiv cu substraturi 2 C. La unele mucegaiuri (*Aspergillus niger*), shuntul glioxilatului este răs-

Fig. 29. — Ciclul glioxilatului; conexiunile sale cu ciclul acizilor tricarboxilici și cu gluconeogeneza. Compușii implicați în ciclul glioxilatului sînt încadrați în cîte un dreptunghi. *E. coli* cultivată pe medii cu acetat, decarboxilează oxalilacetatul pentru a produce fosfoenolpiruvat, de la care începe sinteza pentozelor și hexozelor. Cheia enzimelor: 1. Citrat sintetaza. 2. Aconitaza. 3. Izocitrat liaza. 4. Malat sintetaza. 5. Succinat dehidrogenaza. 6. Fumaraza. 7. Malic dehidrogenaza.

punzător de acumularea de acid citric în mediul de cultură, proprietate utilizată în practică pentru producerea industrială pe cale biologică a acestui acid.

BIOSINTEZA GLUCOZEI. GLUCONEOGENEZA

În afară de funcția anaplerotică — de aprovizionare a ciclului ATC cu acizi dicarboxilici — ciclul glioxilatului are un rol esențial în formarea de pentoze și hexoze de la substraturi cu 2 atomi de C. PEP format prin decarboxilarea oxalilacetatului este un compus-cheie pentru biosinteza de ribozo-5-fosfat, eritrozo-4-fosfat și glucoză, deoarece este punctul de plecare al reacțiilor de gluconeogeneză (glicoliză inversă). Conexiunea dintre cele două cicluri este efectuată de enzima PEP-carboxilază, care produce PEP de la oxalilacetat. Acesta este preluat de enzimele existente ale căilor EMP și HMP, care acționează reversibil și formează ribozo-5-fosfat, eritrozo-4-fosfat și, în final, glucozo-6-fosfat și glucoză.

METABOLISMUL ENERGETIC AL MICROORGANISMELOR

(Pl. 1, 2)

Microorganismele, ca și alte organisme vii, au nevoie de energie pentru biosinteze, creștere și multiplicare, ca și pentru alte activități (mobilitate etc.). Spre deosebire de sistemele nebiologice, care pot converti căldura în energie mecanică și electrică, sistemele biologice sînt, în esență, izotermice și neputînd utiliza căldura, sînt dependente de obținerea energiei prin cuplare chimică cu reacțiile oxidative. Înțelegerea mecanismelor fundamentale prin care microorganismele obțin energia necesară este foarte importantă — dincolo de interesul general teoretic — pentru rațiuni de ordin practic, deoarece posibilitatea de a dirija procesul de consumare a energiei, în condiții experimentale sau în industria biotehnologică, permite reglarea, după necesități, a formării de biomasă sau sinteza unor produși utili.

PRINCIPII GENERALE DE BIOENERGETICĂ A MICROORGANISMELOR

Conceptul de energie liberă. Experiența a demonstrat că în condițiile normale de cultivare a microorganismelor, în medii lichide, la pH neutru și la temperaturi relativ scăzute, pot avea loc spontan numai reacții producătoare de energie sau exergonice. Toate celelalte reacții — inclusiv cele de biosinteză — care necesită consum de energie sînt blocate și nu pot avea loc decît dacă sînt cuplate cu reacțiile producătoare de energie. În același timp, este demonstrat faptul că microorganismele, ca și alte sisteme biologice, nu pot utiliza cantitatea totală de energie a unui sistem, pentru a face un lucru util. La o temperatură dată este făcută disponibilă numai o fracțiune din această energie numită *energia liberă* (G) a sistemului („Gibbs free energy"), care exprimă cantitatea maximă de energie a sistemului, potențial disponibilă pentru efectuarea unui lucru util.

Potențialul energetic al unui sistem biochimic de a asigura efectuarea unei activități utile poate fi exprimat prin diferența de energie liberă ΔG (ΔF, după unii autori) dintre reactanți și produșii reacției, respectiv dintre starea inițială (G_i) a sistemului și starea finală (G_f), după relația generală: $\Delta G = G_f - G_i$.

Datorită faptului că ΔG este supusă unor variații externe (temperatură, pH, concentrația reactanților etc.), ea se apreciază în condiții standard, la pH 7,0 și 25°C, fiind notată cu $\Delta G°'$. Exprimînd variația energiei libere,

valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ reprezintă o măsură a cantității de energie chimică eliberată într-o reacție și deci a capacității sistemului de a face un travaliu. Această valoare determină în ultimă instanță dacă o reacție poate avea loc spontan sau nu. Raportat la o reacție biochimică simplă, în care reactanții (R) sînt convertiți în produsul P, $\Delta G^{\circ\prime}$ reprezintă cantitatea de energie disponibilă pentru transformarea reactanților R în produșii reacției. Cînd energia liberă a reactanților (G_i) este mai mare decît aceea a produșilor (G_f), atunci variația energiei libere, $\Delta G^{\circ\prime}$ va avea o valoare negativă, iar reacția va fi exergonică (ea are loc cu o descreștere a energiei libere). Invers, dacă energia liberă a reactanților (G_i) este mai mică decît energia produșilor rezultați (G_f), $\Delta G^{\circ\prime}$ va avea o valoare pozitivă.

La modul general, se pot întîlni trei situații distincte: 1) cînd $\Delta G < 0$, corespunzînd proceselor care pot avea loc spontan ($\Delta G^{\circ\prime}$ are valoare negativă); 2) $\Delta G > 0$, procese care nu pot evolua spontan ($\Delta G^{\circ\prime}$ are valoare pozitivă) și 3) valoarea $\Delta G^{\circ\prime} = 0$, corespunzînd condițiilor de echilibru, cînd nu există schimb de energie liberă.

REACȚIILE EXERGONICE ȘI ENDERGONICE

În funcție de valoarea diferenței de energie liberă ($\Delta G^{\circ\prime}$), reacțiile metabolismului se pot împărți în două mari categorii:

1) *Reacțiile exergonice*, producătoare de energie, avînd o valoare negativă a energiei libere ($-\Delta G^{\circ\prime}$), corespund unei tranziții de la o stare mai instabilă, cu un conținut mai mare de energie chimică, la o stare mai stabilă, cu un conținut de energie mai mic. Aceste reacții sînt termodinamic favorabile (nu și cinetic manifestate) și potențial spontane.

2) *Reacțiile endergonice*, consumatoare de energie, au o valoare pozitivă a energiei libere ($+\Delta G^{\circ\prime}$). Ele sînt termodinamic nefavorabile și ca atare nu pot avea loc spontan, ci numai cu condiția unui aport de energie. În celule, reacțiile endergonice au loc datorită cuplării lor cu reacții exergonice, care

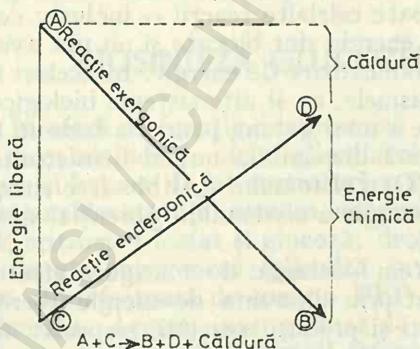


Fig. 30. — Cuplarea reacțiilor exergonice și endergonice. Conversia metabolitului A la B este exergonică. Energia eliberată este în parte folosită în reacția de conversie a metabolitului C la D.

de regulă conferă sistemului, ca întreg, un caracter exergonic (fig. 30). În unele cazuri, această cuplare necesită prezența unui purtător intermediar obligatoriu (ca de exemplu: în cazul cuplării reacțiilor de dehidrogenare cu cele de hidrogenare) (fig. 31).

De foarte multe ori însă, cuplarea se realizează prin sinteza în reacțiile exergonice a unui compus cu potențial macroergic și utilizarea lui în cele endergonice (fig. 32). Acest intermediar — reprezentat de regulă de ATP — fiind lipsit de înrudire structurală cu reactanții reacțiilor respective, poate servi ca transductor de energie, practic pentru cele mai multe reacții exergonice și endergonice.

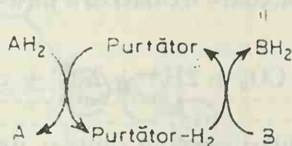


Fig. 31. — Cuplarea reacțiilor de hidrogenare și dehidrogenare printr-un purtător intermediar. A și B, substraturi oxidate; AH_2 și BH_2, substraturi reduse.

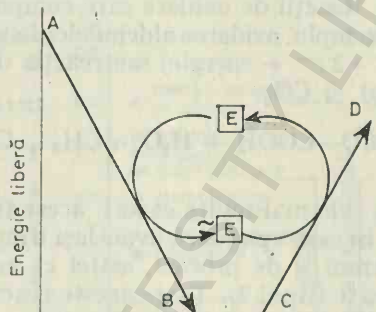


Fig. 32. — Transferul energiei libere de la o reacție exergonică la alta endergonică, prin formarea unui compus intermediar macroergic.

Procesele bioenergetice celulare se supun celor trei legi fundamentale ale termodinamicii care stau la baza transformărilor de energie ce au loc în sistemele chimice, fizice și biologice, cînd se produce tranziția de la o stare la alta. În cursul metabolismului lor, microorganismele realizează o serie de procese de transformări de energie, care condiționează activitățile lor biologice esențiale, ca de exemplu: 1) conversia energiei luminoase fotonice în energie chimică printr-o serie de transformări intermediare; 2) conversia energiei chimice în energie electrică (potențial de membrană) și în energia unui gradient de concentrație (protoni), formînd împreună energia chemiosmotică „forța proton motrice"; 3) conversia energiei chemiosmotice în energie chimică prin sinteza ATP și 4) transformarea energiei chimice stocată în moleculele de ATP în alte forme de energie (calorică, osmotică, mecanică, electrică) care asigură desfășurarea diferitelor activități biologice.

REACȚIILE DE OXIDOREDUCERE ȘI ROLUL LOR ÎN METABOLISMUL ENERGETIC

Microorganismele își procură energia necesară pentru creștere și alte activități prin reacții de oxidare, care sînt de trei tipuri principale:

1) Reacții de oxidare prin simplă pierdere de electroni, ca, de exemplu:

Fe^{2+} (Fe feros, forma redusă) $\xrightarrow{e^-}$ Fe^{3+} (Fe feric, forma oxidată) + e^- + energie. Reacția este întîlnită în cazul oxidării citocromilor:



$$R{-}CH_2OH \longrightarrow R{-}CHO + 2\,H^+ + 2\,e^- + \text{energie}$$

2) Reacții catalizate de dehidrogenaze, care comportă, în același timp, pierdere de electroni și de protoni, ca, de exemplu: oxidarea alcoolilor la aldehide:



$$R{-}CH_2OH \rightarrow R{-}CHO + 2\,H^+ + 2\,e^- + \text{energie}$$

3) Reacții de oxidare care comportă cîștig de oxigen de către substrat, ca, de exemplu, oxidarea aldehidelor la acizi ($R{-}CHO + H_2O \rightarrow R{-}COOH +$ $+ 2\,H^+ + 2\,e^- +$ energie) sau reacția de decarboxilare oxidativă a piruvatului la acetat și CO_2:



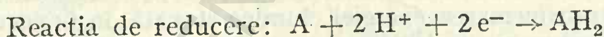
$$CH_3{-}CO{-}COOH + H_2O \rightarrow CH_3{-}COOH + CO_2 + 2H^+ + 2\,e^- + \text{energie}$$

În cele mai multe cazuri, acest tip de oxidări constau dintr-o dehidrogenare, în care apa joacă în același timp rolul de donator de oxigen și de sursă de electroni și de protoni, astfel că reacția nu este decît o variantă a celei precedente (tipul 2). Toate aceste reacții de oxidare biologică au drept caracter comun faptul că, în esență, ele se reduc la o pierdere de electroni de către substrat.

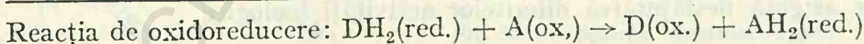
Deoarece, electronul cedat trebuie în mod obligatoriu acceptat de un alt substrat, reacțiile de oxidare biologică sînt cuplate cu reacții de reducere, sub forma unui *cuplu de oxidoreducere*, adică a unui sistem de reacții (sistem redox) în care o substanță se comportă ca donator (D) de electroni, iar alta ca acceptor (A) de electroni. La modul general, reacția de oxidare poate fi definită ca o cedare de electroni. Molecula care cedează electroni este oxidată, iar molecula care îi acceptă este redusă. Datorită rolului important al dehidrogenărilor în reacțiile de oxidoreducere biologică, termenii de donator de hidrogen (DH_2) și acceptor de hidrogen (AH_2) sînt folosiți ca sinonimi cu cei de donator și acceptor de electroni. Reacțiile de oxidoreducere pot fi astfel reprezentate la modul general:



Reacția de oxidare: $DH_2 \rightarrow D + 2\,H^+ + 2\,e^-$



Reacția de reducere: $A + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightarrow AH_2$



Reacția de oxidoreducere: $DH_2(\text{red.}) + A(\text{ox,}) \rightarrow D(\text{ox.}) + AH_2(\text{red.})$

În aceste reacții, simbolul H reprezintă nu numai un atom de H, ci și suma cu sarcină nulă a unui proton și a unui electron ($H \rightarrow H^+ + e^-$).

Tendința unui compus de a ceda sau de a accepta electroni, în reacțiile de oxidoreducere biologică, se exprimă cantitativ prin potențialul de oxidoreducere (redox) E_0' al cuplului, care pentru sistemele biologice se determină, în condiții standardizate, în raport cu potențialul de reducere al hidrogenului, considerat ca potențial de referință. La pH 7,0, acest potențial standard al cuplului $[H^+ + 1\,e^- \rightarrow 1/2\,H_2]$ este de $-0{,}42$ v. Deoarece reacțiile de oxidoreducere implică interconversia unor formereduse și oxidate ($NADPH +$ $+ H^+/NADP^+$; Fe^{2+}/Fe^{3+} etc.), potențialul redox se raportează la perechi sau cupluri redox și nu la o singură substanță. Potențialul substraturilor care

participă în metabolismul microorganismelor este diferit (fig. 33), iar cunoașterea valorilor lui are importanță practică deosebită pentru cultivarea microorganismelor. Cunoașterea potențialului redox E_0' al unei substanțe permite stabilirea modului în care ea va reacționa în reacțiile de oxidoreducere: electronii sînt transferați totdeauna de la un cuplu cu potențial mai negativ la

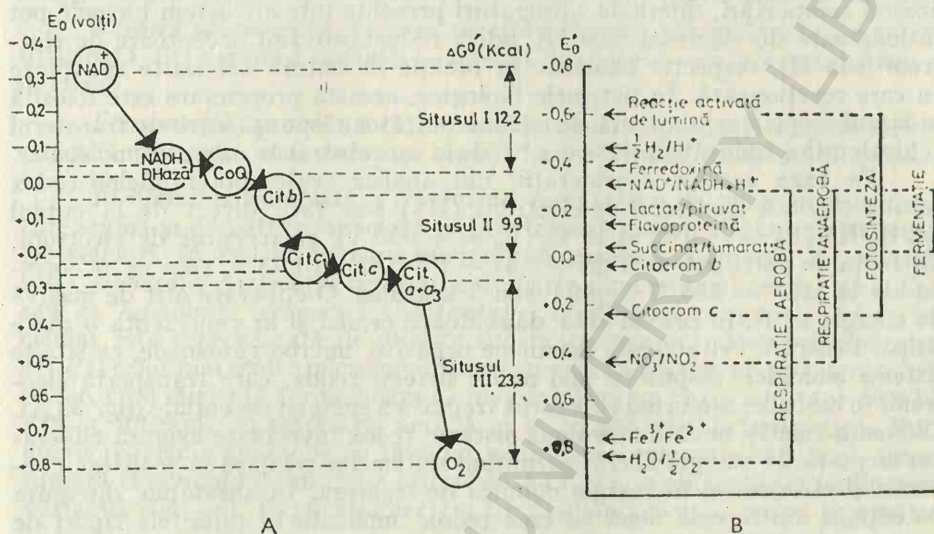


Fig. 33. — **A.** Schema transportului electronilor de la constituentul cu potențial de reducere (E_0') cel mai înalt (NAD^+) la oxigen, care are potențialul cel mai scăzut. Schema evidențiază cele trei situsuri în care variația energiei libere standard ($\Delta G°'$) este suficientă pentru a permite fosforilarea ADP la ATP($\Delta G°'$= 7300 cal.). Toate valorile înscrise corespund transportului unei perechi de electroni (după Berkaloff, 1981)
B. Relațiile dintre diferitele tipuri de producere a energiei la microorganisme și scala de valori a potențialului redox.

un cuplu cu potențial mai puțin negativ. Limitele existente în natură sînt $E_0' = +0{,}82$ (medii bogate în oxigen, lipsite de sisteme biologice care îl utilizează: $O^{2-} \rightarrow 1/2 O_2 + 2e^- = +0{,}82$) și $-0{,}42$ (medii bogate în H_2: $1/2\ H_2 \rightarrow H^+ + e^- = -0{,}42$). Ca regulă generală, substraturile cu E_0' pozitiv, O_2, Fe^{3+} au putere de oxidare (sînt agenți oxidanți sau acceptori de electroni), iar cele cu E_0' negativ, H_2, NADH sînt agenți reducători (donatori de electroni). Există o relație definită între valoarea E_0' a sistemului redox și schimbul de energie liberă standard, $\Delta G°'$, dată de reacția:

$$\Delta G°' = -nF\Delta E_0'$$

în care: $\Delta G°'$ = schimbul de energie standard,
n = numărul electronilor transferați în reacția de oxidoreducere,
$\Delta E_0'$ = diferența de potențial redox între două sisteme redox față de electrodul etalon, exprimată în volți,
F = constanta Faraday, de conversie a volților în calorii (23 063 calorii/volt).

Prin acest concept se poate măsura schimbul de energie liberă, care se produce în reacțiile de oxidoreducere. Din această formulă rezultă că o substanță cu cît este mai redusă, cu atît conține mai multă energie și cu atît mai mare este tendința sa de a ceda electroni. Deci, o substanță cu potențial redox scăzut poate ceda electroni oricărei substanțe mai oxidate decît ea și poate accepta electroni de la orice substanță mai redusă decît ea. Datorită acestei comportări, diferitele substraturi prezente într-un sistem biologic pot fi donatoare de electroni (sau H), adică reductante sau acceptoare de electroni (sau H), respectiv oxidante în funcție de natura celorlalte substanțe cu care reacționează. În sistemele biologice, această proprietate este folosită în lanțul respirator, secvență de enzime-purtător răspunzătoare de transferul echivalenților reducători (H^+sau e^-) de la un substrat la oxigenul molecular.

Pe baza acestor considerații, din analiza scalei potențialelor redox rezultă că dacă transferul de electroni (H^+) s-ar face direct de la cuplul $1/2\ H_2/H^+$ ($E'_0 = -0,42$ v) la O_2 ($E'_0 = +0,81$ v), ca acceptor de electroni, diferența de potențial ar fi de $+0,81 - (-0,42) = 1,23$ v, ceea ce ar corespunde la $\Delta G°' = 238,57$ kg/mol sau 5 kcal/mol. O eliberare atît de masivă de energie ar fi, în primul rînd, dăunătoare celulei și ar reprezenta o mare risipă. Pentru a evita aceste fenomene negative, microorganismele, ca și alte sisteme biologice, dispun de mai multe sisteme redox, care transportă electronii în cascade, asigurînd eliberarea treptată a energiei potențiale (fig. 33,A). Diferența relativ mică dintre două sisteme redox învecinate asigură eliberarea treptată de energie liberă, permițînd sistemelor celulare să realizeze conversia și stocarea ei în energie chimică de legătură. În ansamblu, diferența potențială dintre cele două sisteme redox implicate în diferitele tipuri de procese metabolice determină cantitatea de energie produsă în cursul lor (fig. 33 B).

TIPURILE DE METABOLISM ENERGETIC

Importanța generală a metabolismului energetic în viața microorganismelor, a surselor de energie, a donatorilor de electroni sau de hidrogen și a acceptorului final de electroni, în procesele producătoare de energie, a determinat utilizarea acestora drept criterii de clasificare și nomenclatură a principalelor tipuri de metabolism. În funcție de sursa caracteristică de energie, microorganismele se pot grupa în două categorii:

— *Microorganismele fototrofe sau fotosintetizante* utilizează energia fotonică, datorită capacității lor de a o converti în energie chimică, sub forma legăturilor macroergice din ATP.

— *Microorganismele chemotrofe sau chemosintetizante* își obțin energia prin reacții biochimice de oxidoreducere.

În funcție de natura compușilor folosiți ca donatori de electroni microorganismele prezintă două tipuri caracteristice de metabolism energetic:

— *Microorganismele litotrofe* utilizează ca donatori de electroni diferite substanțe anorganice ca H_2, H_2S, ionii feros, nitrit sau amoniu, pe care le oxidează la apă, sulfat, ionii feric și nitrat, în reacții exergonice cuplate cu sinteza de ATP.

— *Microorganismele organotrofe* folosesc diferiţi compuşi organici ca donatori de electroni.

În funcţie de natura acceptorului final de electroni, microorganismele pot prezenta trei tipuri de metabolism energetic:

Respiraţia aerobă, în cursul căreia reacţiile chimice producătoare de energie necesită prezenţa oxigenului molecular ca acceptor final de electroni.

Respiraţia anaerobă, în care reacţiile chimice producătoare de energie utilizează alţi compuşi organici — diferiţi de oxigen — ca acceptori finali de dectroni.

Fermentaţia, proces în care reacţiile chimice producătoare de energie necesită prezenţa unor compuşi organici ca acceptori finali de electroni.

În definirea completă a tipului de metabolism la microorganisme se ţine seama şi de natura sursei de carbon folosită pentru sinteza constituenţilor celulari, în raport cu care microorganismele se comportă ca *autotrofe* sau *C-autotrofe*, cînd obţin cea mai mare parte din carbonul celular de la CO_2, sau ca *heterotrofe*, respectiv *C-heterotrofe*, cînd sursa principală de carbon celular este reprezentată de diferite substanţe organice. Metabolismul energetic al celor mai multe microorganisme este reprezentat de un proces catabolic linear, cu o eficienţă termodinamică invariabilă şi un cîştig constant de ATP. Aşa se întîmplă în respiraţia aerobă şi în fermentaţia heterolactică. Multe microorganisme anaerobe au însă un metabolism energetic ramificat, fiecare ramură conducînd la un cîştig diferit de ATP şi la o eficienţă termodinamică variabilă (fig. 34). Explicaţia acestui tip de catabolism ar putea fi următoa-

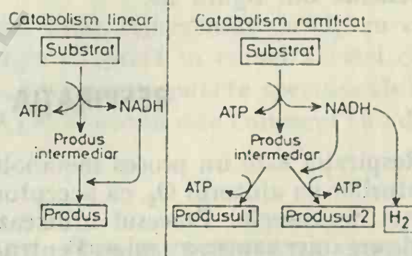


Fig. 34. — Comparaţie între catabolismul linear, cu eficienţă termodinamică constantă a sintezei de ATP şi catabolismul ramificat, cu eficienţă variabilă (după Thauer, Jungermann şi Decker, 1977).

rea. Formarea produşilor pe una din ramificaţii ar putea fi caracterizată printr-o eficienţă termodinamică foarte ridicată a sintezei de ATP, prea mare pentru a putea reprezenta numai metabolismul energetic. Cealaltă cale de formare a produşilor ar fi caracterizată de o eficienţă scăzută (mai mică decît este necesar pentru a asigura un flux metabolic suficient de mare) sau ar avea chiar o eficienţă nulă. În cursul evoluţiei ramificate ratele relative ale celor două procese parţiale sînt ajustate în aşa fel încît cîştigul global de ATP şi eficienţa termodinamică a sintezei lui sînt optime. Între procesele catabolice ramificate cu eficienţă termodinamică .şi biosinteză de ATP variabilă sînt de citat: fermentaţia acetoetilică produsă de *Clostridium kluyveri* şi fermentaţia glucozei realizată de *Cl. pasteurianum*, *Lactobacillus casei* ş.a. (De Vries şi colab., 1970, Thauer şi colab., 1977).

Din datele prezentate rezultă că unele microorganisme folosesc surse externe de energie primară (care nu sînt produse de alte organisme), ca, de exemplu, lumina sau compuşii simpli anorganici, în timp ce altele folosesc surse secundare, cum sînt substanţele organice complexe, sintetizate în mod obişnuit de alte organisme şi în cele din urmă de organismele autotrofe. În toate cazurile însă, microorganismele nu pot folosi direct sursele de energie externe, ci numai după ce le convertesc în forme de energie utilizabile în metabolismul lor. Mecanismele majore de conversie a energiei, atît în cazul

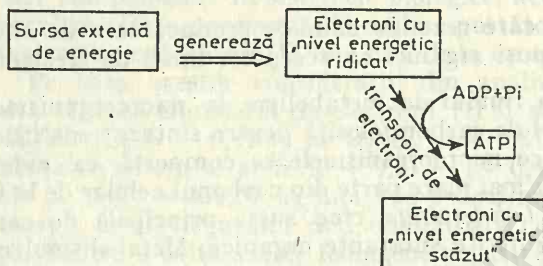


Fig. 35. — Reprezentare schematică a etapelor de conversie a energiei provenită dintr-o sursă externă, în energie chimică de legătură.

surselor primare, cît şi al celor secundare sînt corelate, în ultimă instanţă, cu o serie de procese cuplate de oxidoreducere, care implică transferul de electroni de-a lungul unei serii de purtători intermediari, legaţi în aşa fel încît energia eliberată treptat de-a lungul lanţului este convertită în energie chimică de legătură prin sinteza de ATP. În linii mari, acest proces evoluează după schema din figura 35.

RESPIRAŢIA AEROBĂ

Respiraţia este un proces metabolic exergonic, de oxidare completă a substraturilor cu ajutorul O_2, ca acceptor final de H, şi eliberarea unei cantităţi mari de energie. Procesul utilizează ca donatori de electroni diferite molecule organice sau anorganice. Pentru a fi deosebite de respiraţia anaerobă, procesele respiratorii dependente de O_2 sînt numite *respiraţie aerobă*. Prin respiraţie se realizează degradarea oxidativă a compuşilor cu un potenţial energetic ridicat — de exemplu, glucoza — însoţită de prelucrarea energiei eliberate şi utilizarea ei pentru sinteza de ATP. Acest tip de metabolism este întîlnit la numeroase grupuri fiziologice de microorganisme (tabelul nr. 12).

Un mecanism metabolic cu importanţă esenţială în respiraţie este ciclul acizilor tricarboxilici, care continuă glicoliza sau căile alternative ei, ce asigură oxidarea terminală a substraturilor şi degradarea piruvatului la CO_2 şi H_2O.

Sistemele enzimatice ale respiraţiei sînt legate de structura celulei, fiind incluse în mitocondrii la microorganismele eucariote şi în membrana plasmatică şi diverticulii ei (mezosomii) la bacterii. Caracteristica fundamentală a sistemelor enzimatice respiratorii este reprezentată de prezenţa unui set

special de enzime-transportor, care formează *catena de respirație celulară*, grație căreia electronii și/sau protonii (H^+), cedați de substratul oxidabil, sînt transportați treptat, printr-o serie de purtători intermediari de electroni

Tabelul nr. 12

Bacteriile care utilizează O_2 ca acceptor

Grupul fiziologic	Genurile	Oxidările efectuate	Heterotrofie facultativă
Bacteriile care oxidează hidrogenul	*Pseudomonas, Alcaligenes, Paracoccus anterior genul Hydrogenomonas)*	$H_2 \rightarrow H_2O$	Universală; utilizează un număr mare de substraturi organice
Bacteriile care oxidează amoniacul	*Nitrosomonas, Nitrosolobus, Nitrosocystis* etc.	$NH_3 \rightarrow NO_2^-$	Rară, limitată sau absentă
Bacteriile care oxidează nitriții	*Nitrobacter, Nitrococcus* etc.	$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$	Rară, limitată sau absentă
Bacteriile care oxidează sulful și derivații săi (Sulfobacteriile)	*Thiobacillus, Beggiatoa, Thiothrix*	H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$ $\rightarrow SO_4^{2-}$	Variabilă în cadrul grupului
Bacteriile care oxidează fierul (Ferobacteriile)	*Thiobacillus ferrooxidans, Gallionella*	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$	Absentă

și/sau de hidrogen, pînă la acceptorul final, reprezentat de O_2, cu care se combină pentru a forma H_2O. Energia eliberată în cursul acestei călătorii „la vale" a electronilor este cuplată, în anumite puncte specifice ale catenei de respirație celulară, cu sinteza de ATP. Procesul este cunoscut sub denumirea de *fosforilare oxidativă*.

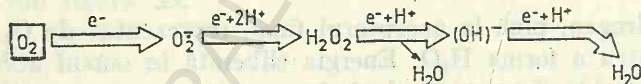
MECANISME MOLECULARE CARE PERMIT RESPIRAŢIA AEROBĂ. BIOLOGIA RADICALULUI SUPEROXID. SUPEROXID DISMUTAZELE

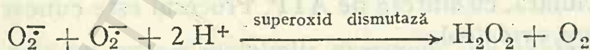
Cercetări mai recente au demonstrat că deși oxigenul molecular este indispensabil pentru viața multor organisme, utilizarea lui poate duce în unele cazuri la apariția unor compuși foarte toxici pentru celula vie. Datorită acestui fapt, bacteriile obligat anaerobe (*Clostridium*, bacteriile metanogene etc.) mor dacă sînt expuse la aer. De asemenea, concentrațiile de O_2 mai mari decît cele din aer sînt toxice pentru cele mai multe microorganisme aerobe. Aceasta demonstrează că deși modul de viață aerob oferă mari avantaje, el este, în același timp, foarte primejdios. Inițial, efectul letal al O_2 a fost pus exclusiv pe seama produsului reducerii lui, peroxidul de H (H_2O_2),

care se formează ori de cîte ori H activat, în formă de flavoproteine reduse sau proteine FeS reduse, vin în contact cu O_2, în prezența oxidazelor, după reacția: $FADH_2 + O_2 \xrightarrow{oxidază} FAD + H_2O_2$.

Natura efectelor toxice exercitate de aerobioză asupra anumitor microorganisme a fost lămurită de Fridovich (1978), care a demonstrat rolul major al radicalului superoxid (care se formează ușor, are o mare stabilitate și o toxicitate foarte mare), ca agent al toxicității oxigenului, și, totodată, funcția superoxid dismutazelor, de componenți esențiali ai reacțiilor biologice de apărare față de acest efect. El a demonstrat că, reducerea completă a unei molecule de oxigen la apă necesită intervenția a 4 electroni și că în cursul procesului secvențial univalent care asigură această reducere se formează obligatoriu mai mulți compuși intermediari, ca radicalul anionic superoxid ($O_2^{\bar{\cdot}}$), peroxidul de H (H_2O_2) și radicalul hidroxil $(OH)^-$, care sînt prea reactivi pentru a fi tolerați de sistemele biologice. Prima reacție de apărare împotriva lor este furnizată de enzimele care îi transformă catalitic la produși inofensivi. Peroxidul de hidrogen este îndepărtat de *catalaze*, prin conversa la H_2O și O_2, sau de *peroxidaze*, care îl reduc la apă, utilizînd o serie de reducători prezenți în celulă. Ionul $O_2^{\bar{\cdot}}$ este eliminat de *superoxid dismutaze* (SOD), care catalizează conversia lui la H_2O_2 și O_2.

Îndepărtarea eficientă a primilor doi intermediari ai procesului de reducere ($O_2^{\bar{\cdot}}$ și H_2O_2) este deosebit de importantă deoarece împiedică formarea celui de-al treilea $(OH)^-$, care este foarte reactiv și a cărui degradare enzimatică nu este posibilă. Calea univalentă a reducerii oxigenului și reacțiile enzimatice de apărare împotriva intermediarilor nocivi este, după Fridovich (1978), următoarea:

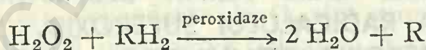




$$O_2^{\bar{\cdot}} + O_2^{\bar{\cdot}} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{superoxid dismutază}} H_2O_2 + O_2$$



$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaze}} 2\,H_2O + O_2$$



$$H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{\text{peroxidaze}} 2\,H_2O + R$$

Formarea ionului superoxid. Ionul superoxid ($O_2^{\bar{\cdot}}$) derivă din oxigenul molecular prin adiția unui electron. El apare în mod constant în reacțiile biologice de reducere a O_2, dar reacția predominantă, răspunzătoare de producerea lui, este încă necunoscută. Probabil că $O_2^{\bar{\cdot}}$ rezultă din captarea primului electron cedat de un substrat în reacțiile de oxidare și reprezintă un intermediar prezent numai tranzitoriu, incapabil să se acumuleze deoarece suferă o reacție de dismutare spontană după formula: $2O_2^{\bar{\cdot}} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$.

În afară de aceasta, celulele aerobe posedă diferite mecanisme care diminuă producția de $O_2^{\bar{\cdot}}$ și reduc toxicitatea O_2 prin evitarea producerii de $O_2^{\bar{\cdot}}$ și H_2O_2. Spre exemplu, în celulele care respiră, cea mai mare parte din $O_2^{\bar{\cdot}}$ este utilizată de citocromoxidază care îl reduce la apă, fără producere de

O_2 sau H_2O_2. Cu toate acestea, O_2 este produs în mod cert în celulele care respiră, în cantităţi greu de apreciat, datorită prezenţei ubicvitare a superoxid dismutazelor. În celulele de *Streptococcus faecalis*, la care activitatea enzimei a fost inhibată cu ajutorul anticorpului corespunzător, ~ 17% din O_2 consumat duce la producerea de O_2^{-}.

Activitatea protectoare a superoxid dismutazelor. Superoxid dismutazele*) sînt enzime capabile să distrugă specific radicalul O_2^{-}. Au fost descoperite de McCord şi Fridovich (1968), care au demonstrat prezenţa lor constantă la toate organismele aerobe şi rolul lor ca sistem de apărare faţă de toxicitatea O_2^{-}. Singurele organisme care nu posedă SOD sînt bacteriile anaerobe stricte, adică cele care în prezenţa O_2 nu numai că nu se dezvoltă, dar sînt chiar rapid omorîte. Bacteria *Lactobacillus plantarum*, tolerant aerobă, nu are SOD, dar este incapabilă să desfăşoare metabolism aerob. Ca urmare, nu are nevoie de apărare faţă de O_2, deoarece nu poate reduce O_2 la O_2^{-}. S-a demonstrat, de asemenea, că expunerea unor microorganisme facultativ aerobe ca *E. coli*, *S. faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae* la O_2 duce la o creştere a acumulării intracelulare a SOD. În plus, nivelul crescut de SOD în unele celule este corelat cu rezistenţa crescută faţă de efectul letal al O_2 hiperbaric.

Rolul esenţial al SOD în mecanismele de apărare ale celulelor faţă de radicalul superoxid este demonstrat şi de sensibilitatea faţă de acest ion a mutantelor bacteriene care prezintă modificări în activitatea acestor enzime. Aceste fapte de observaţie, precum şi corelaţia riguroasă dintre absenţa SOD şi toxicitatea O_2 stau la baza teoriei lui McCord şi Fridovich (1971), care postulează existenţa la toate organismele aerobe a unui sistem de apărare obligatoriu faţă de toxicitatea ionului de O_2^{-} reprezentat de superoxid dismutaze. Prezenţa catalazei reprezintă un mecanism de protecţie suplimentară faţă de H_2O_2, care reprezintă un subprodus, mai puţin toxic, al ionului superoxid.

Tipurile de superoxid dismutaze. Au fost descrise trei tipuri de SOD, care catalizează aceeaşi reacţie şi au o eficienţă comparabilă, dar care diferă prin natura metalului din structura lor: *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD*.

FeSOD şi MnSOD sînt caracteristice celulelor procariote, iar CuZnSOD celor eucariote. Bacteriile Gram-pozitive conţin, în mod obişnuit, numai MnSOD, cu excepţia *Staphylococcus aureus* şi *B. cereus*, care posedă FeSOD. Bacteriile Gram-negative conţin atît FeSOD, cît şi MnSOD. Cele două tipuri de enzime sînt foarte înrudite, nu numai ca acţiune, ci şi ca omologie în secvenţa acizilor aminaţi. La *E. coli*, cele două dismutaze răspund diferit faţă de prezenţa O_2: FeSOD, localizată în membrana plasmatică şi în peretele celular, pare să joace — datorită poziţiei sale — rol în apărarea bacteriilor de agresiunile ionului O_2^{-} provenit de la exterior. Ea este produsă constant, indiferent de prezenţa sau de absenţa O_2 în mediu. MnSOD localizată intracelular este produsă numai în prezenţa O_2. Transferul celulelor din anaerobioză în aerobioză determină inducţia rapidă a sintezei de MnSOD. Dovada rolului protector al MnSOD este faptul că, în cazurile în care bacteriile cultivate în

*) Dismutaţia (disproporţionarea) este o reacţie de oxidoreducere între moleculele unei combinaţii aflată la o treaptă intermediară de oxidare prin care o parte a combinaţiei trece într-o treaptă mai ridicată de oxidare, iar cealaltă într-o treaptă mai scăzută de oxidare.

anaerobioză, conţinînd foarte puţină MnSOD, sînt expuse la concentraţii mari de oxigen sînt foarte rapid omorîte, în timp ce celulele care conţin concentraţii ridicate din această enzimă, suportă bine tratamentul (Gregory şi Fridovich, 1973).

Celulele eucariote conţin, în general, CuZnSOD şi MnSOD. La levuri, ca şi la multe celule animale studiate, MnSOD este localizată în matricea mitocondrială, iar CuZnSOD în citosol.

Un caz aparte prezintă bacteria *Photobacterium leiognathi*, care conţine atît CuZnSOD, cît şi FeSOD. Adaptată de-a lungul evoluţiei la viaţa simbiotică, *P. leiognathi* este singura bacterie care posedă CuZnSOD, cunoscută pînă în prezent datorită, probabil, transferului de gene de la gazda sa eucariotă, reprezentată de diferite specii de peşti (Reichelt şi Hastings, 1977). MnSOD mitocondriale şi cele bacteriene au secvenţe de aminoacizi omologe, fapt care pledează pentru ipoteza că mitocondriile au evoluat prin simbioza endocelulară între o celulă procariotă şi o celulă protoeucariotă (Steinman şi Hill, 1973).

Efectele nocive ale ionului O_2^- sînt legate, în primul rînd, de marea sa reactivitate. Ca şi cei mai mulţi radicali, ionul O_2^- acţionează fie ca reducător, fie ca oxidant. Deşi efectele sale negative sînt bine cunoscute, mecanismele intime ale reacţiilor prin care sînt produse nu sînt încă descifrate. Ionul O_2^- inactivează virusurile şi este toxic pentru culturile bacteriene, probabil prin producerea de alterări ale proteinelor şi acizilor nucleici (Lavelle, 1973), prin peroxidarea lipidelor şi prin legarea membranelor, urmată de un efect bactericid. Există date după care efectul toxic nu este determinat de ionul O_2^- ca atare. El ar fi precursorul unui oxidant mult mai puternic, a cărui formare depinde de prezenţa concomitentă a H_2O_2. Efectele nocive au o extindere mult mai mare decît s-a crezut iniţial. Astfel, oxigenul, prin intermediul O_2^-, măreşte puterea mutagenă şi letalitatea radiaţiilor ionizante. De asemenea, O_2^- acţionează ca activator al hidrocarburilor cancerigene şi ar participa la fenomenele de îmbătrînire.

Dismutaţia oxigenului molecular fie că se face spontan, fie că are loc prin cataliză enzimatică (sub acţiunea superoxid dismutazelor) produce H_2O_2, care este el însuşi o substanţă cu efecte dăunătoare. H_2O_2, la rîndul său, este degradat de catalaze şi peroxidaze, enzime care acţionează sinergic pentru a proteja celulele care respiră, de consecinţele negative ale producerii de O_2^- şi de H_2O_2.

Acţiunile pozitive ale ionului O_2^-. Este cunoscută acţiunea bactericidă a unor antibiotice ca *streptonigrina, mitomicina, adriamicina şi porfiromicina*, care ar fi datorită producerii de O_2^- în cursul oxidării sau ar fi potenţată de acest radical. Ionul O_2^- este răspunzător de acţiunea bactericidă a leucocitelor, în cursul procesului de fagocitoză. Granulocitele activate produc O_2^- pe cale enzimatică, avînd ca efect depolimerizarea hialuronatului, exacerbarea şi prelungirea procesului inflamator şi moartea celulelor bacteriene. În sprijinul acestor date pledează faptul că injecţia locală de superoxid dismutaze are efect antiinflamator, precum şi faptul că producerea de O_2^- este foarte redusă la bolnavii care au leucocite cu activitate deficitară.

CREŞTEREA ÎN ABSENŢA OXIGENULUI

Capacitatea de a creşte practic indefinit în condiţii anaerobe este aproape exclusiv limitată la procariote (Schlägel şi Jannasch, 1981). În cazul eucariotelor, producerea anaerobă de energie este un proces tranzitoriu, prezent în cursul unei activităţi intense sau al expunerii la medii hipoxice (Bennett, 1978). Există numai cîteva excepţii reprezentate de unele protozoare ciliate holotriche şi entodiniomorfe care trăiesc în rumen. De asemenea, *Entamoeba, Diplomonas* şi *Trichomonas*, care nu au mitocondrii, cresc în condiţii de anaerobioză strictă. Unii fungi din genul *Fusarium* şi *Mucor* pot creşte slab în anaerobioză. Energia pentru creşterea anaerobă a bacteriilor poate fi obţinută pe trei căi: 1) prin fotosinteză anoxigenică (tabelul nr. 13); 2) prin respiraţie anaerobă şi 3) prin fermentaţie.

Tabelul nr. 13

Grupurile de bacterii fototrofe anaerobe (după Schlägel şi Jannasch, 1981)

Denumirea grupului	Specia reprezentativă	Creşterea: Anaerobă la lumină	Creşterea: Anaerobă la întuneric	Donatorii de electroni fotosintetici	Depunerea sulfului
Bacterii nesulfuroase purpurii	*Rhodospirillum rubrum*	+	(+)	H_2, organici (S^0)	Extracelular
Bacterii sulfuroase purpurii	*Chromatium okenii*	+	—	S^{2-}, S^0, $S_2O_3^{2-}$, H_2	Intracelular
Bacterii sulfuroase verzi	*Chlorobium limicola*	+	—	S^{2-}, S^0, $S_2O_3^{2-}$, H_2	Extracelular
Grupul *Chloroflexus*	*Chloroflexus aurantiacus*	+	(+)	organici	—

RESPIRAŢIA ANAEROBĂ

Conversia energiei în anaerobioză este similară respiraţiei aerobe din punctul de vedere al donatorilor de electroni, care pot fi compuşi organici sau anorganici. Respiraţia anaerobă se deosebeşte însă fundamental de cea aerobă prin natura acceptorilor finali de electroni (diferiţi de O_2) şi a produşilor finali (fig. 36), care permit clasarea bacteriilor anaerobe în mai multe grupuri fiziologice (tabelul nr. 14).

Respiraţia anaerobă a fost descrisă drept caracteristică bacteriilor capabile să reducă nitratul la forme mult mai reduse ale N, prin procesul de denitrificare *(respiraţia nitratului)*. Ulterior s-a demonstrat că cele mai multe bacterii care reduc nitratul sînt facultativ anaerobe, deoarece în aerobioză transferă electronii la O_2 şi în absenţa acestuia la NO_3^-, care funcţionează ca un accep-

tor de electroni foarte eficient: pentru fiecare moleculă de nitrat redus pot fi acceptați 5 electroni, după reacția: $2\,NO_3^- + 10\,e^- + 12\,H^+ \rightarrow N_2 + 6\,H_2O$. Această comportare este datorită faptului că bacteriile denitrificatoare au o catenă de respirație celulară care le permite să desfășoare o respirație de tip aerob în prezența O_2, reducerea nitratului reprezentînd o cale alternativă, activă în anaerobioză. Producerea de energie este echivalentă în calea aerobă și în cea de reducere a nitratului (anaerobă).

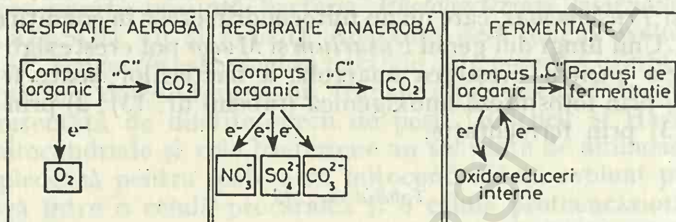


Fig. 36. — Deosebirile legate de transportul electronilor (e^-), metabolismul compușilor carbonului („C") și natura acceptorului final de electroni, în cursul oxidării unei surse organice de energie, prin respirație aerobă, respirație anaerobă și fermentație.

Tabelul nr. 14

Principalele categorii de bacterii care trăiesc în condiții de anaerobioză utilizînd acceptori de electroni externi pentru transportul electronilor („respirație anaerobă") (după Schlägel și Jannasch, 1981)

Denumirea grupului	Specia reprezentativă	Procesul metabolic	Acceptorul de electroni	Produșii reducerii
Bacterii denitrificatoare	*Pseudomonas denitrificans*	Respirația nitratului	NO_3^-	N_2, N_2O, NO_2^-
Bacterii sulfatreducătoare	*Desulfovibrio vulgaris*	Respirația sulfatului	SO_4^-	S^{2-}
Bacterii sulfreducătoare	*Desulfuromonas acetooxidans*	Respirația sulfului	S^0	S^{2-}
Bacterii metanogene	*Methanobacterium thermoautotrophicum*	Respirația carbonatului	CO_2	CH_4
Bacterii acetogene	*Acetobacterium woodii*	Respirația carbonatului	CO_2	CH_3-COOH

Respirația anaerobă este caracteristică și bacteriilor sulfatreducătoare, celor care reduc Fe^{3+} la Fe^{2+} și celor metanogene, care reduc CO_2 la metan. Acestea prezintă însă unele deosebiri importante față de bacteriile denitrificatoare. Astfel, bacteriile sulfatreducătoare și cele metanogene sînt anaerobe stricte, care nu conțin o catenă de respirație celulară, iar energia eliberată

în reacțiile lor este mult mai mică. Pe aceste criterii, Gottschalk (1979) rezervă termenul de respirație anaerobă pentru biochimia bacteriilor denitrificatoare și consideră reducerea sulfaților și a CO_2 ca procese fermentative.

Pentru cultivarea bacteriilor strict anaerobe nu este suficientă simpla excludere a O_2, ci este necesară existența unui mediu cu potențial redox (E_0') foarte scăzut. Potențialul E_0' al mediilor bogate în O_2, în absența unor sisteme capabile să-l utilizeze este de + 0,82 v, iar al mediilor aflate în contact cu aerul de la + 0,2 la + 0,4 v, la pH 7,0. Or, anaerobii stricți nu tolerează decît medii cu un potențial E_0' de la —0,2 la —0,3 v. De aceea, se recomandă utilizarea unor medii intens reducătoare, realizată prin încorporarea unor compuși care conțin grupări sulfhidrilice, ca, de exemplu, tioglicolat de Na (mercaptoacetat), cisteină, sulfură de Na.

MICROORGANISMELE FACULTATIV ANAEROBE

În concepția clasică, microorganismele facultativ anaerobe sînt definite în mod obișnuit prin trei caracteristici: 1) capacitatea de a crește aerob, utilizînd O_2 (respirație aerobă), sau anaerob, utilizînd compuși organici (fermentație), ca acceptori finali ai electronilor produși în cursul catabolismului; 2) utilizarea preferențială a O_2, cînd este disponibil, datorită producerii superioare de energie în cursul respirației (36 moli ATP/mol de hexoză obținuți în respirație, față de 2 moli în fermentație); 3) rata mai mică de degradare a zaharurilor în aerobioză decît în anaerobioză (ca o consecință a producerii mărite de ATP), fenomen cunoscut sub denumirea de efectul Pasteur (inhibarea fermentației de către respirație).

Analizînd aceste caracteristici în lumina unor date experimentale, Lagunas (1982) scoate în evidență unele aspecte discutabile care impun cu necesitate unele nuanțări ale acestui concept.

Astfel, capacitatea de a crește aerob sau anaerob nu are un caracter definitoriu, deoarece există microorganisme care au nevoie de O_2 pentru anumite reacții biosintetice și care nu cresc anaerob decît dacă sînt aprovizionate cu anumiți compuși, chiar dacă producerea de energie este corespunzătoare. De asemenea, utilizarea preferențială a respirației nu este un caracter universal, deoarece foarte multe microorganisme capabile de respirație și de fermentație preferă calea fermentativă, în ciuda randamentului mai scăzut de producere de ATP, ori de cîte ori în mediu este prezent un substrat fermentabil. Această comportare este determinată de o represie a enzimelor respiratorii în prezența zaharurilor (Botsford, 1981) care face din fermentație o cale metabolică principală. Cînd zaharurile sînt complet folosite sau ajung la o concentrație foarte scăzută, enzimele respiratorii sînt dispersate și microorganismul utilizează respirația ca o cale importantă pentru catabolism. Deși represia enzimelor respiratorii este prezentă atît la procariote (*E. coli*), cît și la eucariote (*S. cerevisiae*) acest fenomen este trecut cu vederea.

În sfîrșit, s-a demonstrat că modificările în rata de utilizare a zaharurilor în funcție de prezența sau absența O_2 sînt mult mai puțin generale decît s-a considerat pînă în prezent. În orice caz, efectul Pasteur nu apare la *S. cerevisiae* (Lagunas, 1979; Vissers și colab., 1982) și probabil nici la *E. coli* (Holzer și Witt, 1958), deși în foarte multe lucrări se menționează că el este impor-

tant la aproape toate celulele care pot folosi alternativ respirația și fermentația și că a fost descris prima dată de Pasteur la *S. cerevisiae*.

După Lagunas (1981, 1982), această discrepanță între faptele reale și aspectele teoretice este o consecință a interpretării greșite de către biochimiștii moderni a datelor lui Pasteur. În concluzie, el consideră că:

— efectul Pasteur se observă atît la *S. cerevisiae*, ca și la *E. coli* numai în condiții experimentale speciale;

— criteriile prin care sînt definite microorganismele facultativ anaerobe se întîlnesc mult mai puțin general decît se presupune;

— aceste criterii supraestimează importanța producerii de ATP în detrimentul altor aspecte de fiziologie celulară;

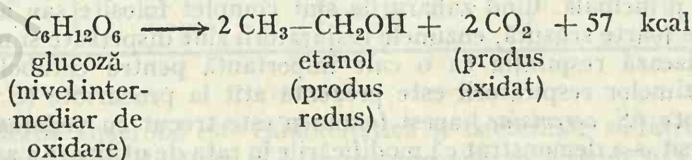
— ținînd seama de faptele de observație, microorganismele facultative anaerobe trebuie definite simplu și pragmatic prin capacitatea lor de a crește aerob și anaerob, lăsînd la o parte celelalte proprietăți, care nu le sînt comune tuturor;

—în mod special, *S. cerevisiae* trebuie abandonată ca model experimental de microorganism facultativ anaerob, deoarece nu îndeplinește această condiție (Lagunas, 1982).

FERMENTAȚIA

Definită de Pasteur (1861) ca „viață fără aer", fermentația este un proces de catabolism, care are loc în condiții de anaerobioză și în care energia este obținută prin utilizarea unor compuși organici, atît ca donatori, cît și ca acceptori de electroni. Microorganismele care produc fermentații sînt fie facultative, fie obligatoriu anaerobe. Cele facultativ anaerobe sînt, de regulă, microorganisme heterotrofe, capabile de respirație în prezența O_2 și care produc fermentații în absența acestuia. Cele obligat anaerobe nu se pot dezvolta aerob, deoarece au pierdut capacitatea de a face sinteza constituenților lanțului transportor de electroni. Foarte multe microorganisme anaerobe nu tolerează prezența O_2, fiind omorîte în contact cu aerul.

În cursul fermentațiilor, anumiți compuși organici, de regulă doi metaboliți diferiți, derivați dintr-un substrat fermentabil, utilizat ca sursă de energie, servesc deopotrivă ca donatori și acceptori de electroni. Rezultă un amestec de produși finali din care unii sînt mai oxidați, alții mai reduși decît substratul fermentat. Un exemplu tipic este procesul de oxidare a glucozei de către levuri în absența O_2:



$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3{-}CH_2OH + 2\,CO_2 + 57 \text{ kcal}$$

glucoză (nivel intermediar de oxidare) — etanol (produs redus) — CO_2 (produs oxidat)

prin care unii atomi de C (de exemplu, cei din CO_2) devin mai oxidați decît glucoza, în timp de alții (cei din etanol) devin mult mai reduși, deoarece molecula are mai mulți H și mai mulți electroni/atom de C decît glucoza.

Procesele fermentative menţin totdeauna un echilibru strict de oxido-reducere, în sensul că nivelul mediu de oxidare al produşilor finali este identic cu cel al substratului fermentat (în exemplul citat, numărul de echivalenţi molari de C, H şi O în produşii finali este acelaşi ca în substrat, cu o mică corecţie pentru asimilarea în compuşi celulari). În cursul fermentaţiei se eliberează numai o mică parte din energia conţinută în substrat, restul rămînînd fixată în produşii fermentaţiei. Energia eliberată este parţial conservată prin procesul de fosforilare la nivelul substratului, care asigură producerea a 2 molecule de ATP per moleculă de glucoză degradată.

Mecanismul biochimic al fermentaţiilor limitează natura compuşilor organici ce pot fi degradaţi pe această cale, deoarece ei nu trebuie să fie nici foarte oxidaţi, nici foarte reduşi. Gama substanţelor fermentabile este foarte largă şi cuprinde poliglucide (celuloză, amidon, chitină), diglucide (zaharoză, lactoză, maltoză), hexoze (glucoză, fructoză, galactoză), pentoze, polialcooli (glicerol şi manitol), iar în cazul bacteriilor, aminoacizi, acizi organici, purine, pirimidine etc.

Produşii fermentaţiilor sînt, de asemenea, foarte diferiţi ca natură, cuprinzînd alcooli (etanol, propanol, butanol, 2,3-butandiol, glicerol), acizi (lactic, formic, acetic, propionic, butiric etc.), esteri (etilacetat, etilbutirat, poli-β-hidroxibutirat etc.), gaze (H_2, CH_4, CO_2) ş.a.

Procesul cel mai bine cunoscut este fermentaţia glucozei, care este totdeauna iniţiată printr-o fosforilare pe seama ATP, cu producere de glucozo-6-fosfat, care este ulterior convertit la acid piruvic, intermediarul metabolic-cheie în metabolismul fermentativ al tuturor carbohidraţilor (fig. 37). În

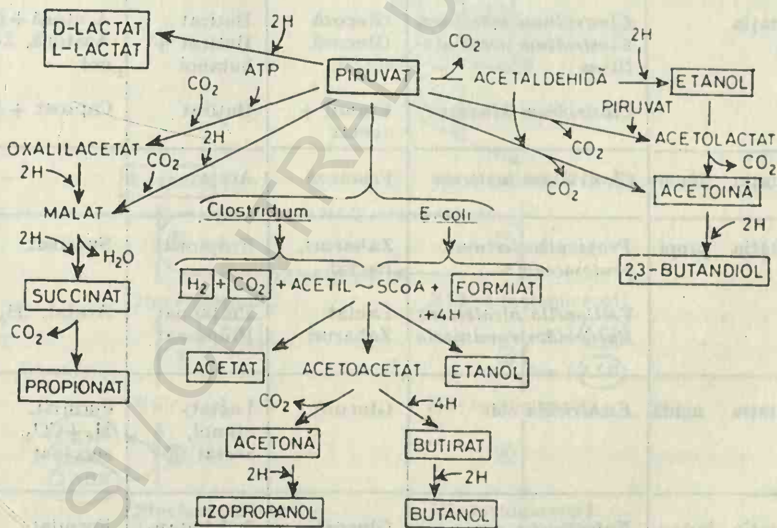


Fig. 37. — Rolul de intermediar-cheie al piruvatului în metabolismul fermentativ al glucidelor.

timp ce în ţesuturile animale piruvatul este oxidat la CO_2 şi H_2O, la microorganisme, de regulă, are loc o oxidare incompletă, însoţită de acumularea unui număr mare de produşi de fermentaţie. Reacţiile care decurg de la piruvat variază foarte mult de la un microorganism la altul, atît în ceea

ce privește căile biochimice urmate, cît și natura produșilor finali. În timp ce drojdiile și lactobacilii homofermentativi fac fermentații pure, producînd aproape exclusiv alcool, respectiv acid lactic și numai urme din alți produși, foarte multe bacterii metabolizează acidul piruvic mai departe, ducînd la formarea unor produși caracteristici ca: acid butiric, alcool butilic, acetonă, acid propionic, izopropanol etc.

Fermentațiile sînt, în mod obișnuit, clasificate și denumite după natura produsului lor final major (tabelul nr. 15).

Tabelul nr. 15

Principalele bacterii fermentative capabile să crească în condiții de anaerobioză și produșii lor de fermentație (după Schlägel și Jannasch, 1981)

Denumirea fermentației	Microorganismele producătoare	Substratul fermentat	Produșii fermentației	
			Majori	Minori
Fermentația alcoolică	*Zymomonas mobilis*	Glucoză	Etanol	CO_2
Fermentația lactică				
— homofermentativă	*Lactobacillus casei*	Glucoză	Lactat	—
— heterofermentativă	*Leuconostoc mesenteroides*	Glucoză	Lactat	Etanol, CO_2
— heterofermentativă	*Bifidobacterium bifidum*	Glucoză	Acetat	Lactat
Fermentația butirică	*Clostridium butiricum*	Glucoză	Butirat	Acetonă + H_2 + CO_2
	Clostridium acetobutylicum	Glucoză	Butirat + butanol	Acetonă, 2-propanol
	Clostridium kluyverii	Etanol + acetat	Butirat	Caproat + H_2
Fermentația homoacetică	*Clostridium aceticum*	Fructoză	Acetat	—
Fermentația propionică	*Propionibacterium pentosaceum*	Zaharuri, Lactat	Propionat	Succinat
	Veillonella alcalescens	Lactat	Propionat	Acetat, H_2, CO_2
	Bacteroides ruminicola	Zaharuri	Propionat	—
Fermentația acidă mixtă	*Escherichia coli*	Glucoză	Lactat, etanol, acetat	Formiat, H_2 + CO_2, succinat
Fermentația butandiol	*Enterobacter aerogenes*	Glucoză	2, 3-butandiol, etanol	Formiat, H_2 + CO_2
Fermentația compușilor azotați	*Clostridium tetanomorphum*	Glutamat	Butirat	Acetat, CO_2, NH_2
	Clostridium sticklandii	Lizină	Butirat	Acetat, NH_3
	Clostridium oroticum	Orotat	Acetat	CO_2, NH_2

În laborator, condițiile de anaerobioză necesitate de fermentații se pot realiza relativ ușor, prin însămînțarea în flacoane cu medii lichide, complet umplute, acoperite lax cu un dop de sticlă, pentru a permite eliminarea gazelor (Davis, 1969).

În industrie, ele sînt înlocuite cu fermentatoare, în care O_2 nu poate pătrunde în profunzime, iar incubarea se face fără agitare. Cu timpul, O_2 din faza gazoasă de la suprafața mediului este înlocuit cu CO_2 produs în timpul fermentației, care este mai greu. De menționat că în terminologia uzuală din industrie noțiunea de fermentație este extinsă în mod arbitrar la orice proces realizat de către microorganisme, la scară mare, chiar dacă evoluează în condiții de aerare puternică (spre exemplu, producerea de antibiotice). Cele mai multe fermentații au o importanță deosebită deoarece furnizează produși cu valoare economică ridicată, care pot fi obținuți pe scară industrială. În unele cazuri, capacitatea de utilizare a anumitor zaharuri este foarte caracteristică și poate fi folosită drept criteriu taxonomic pentru caracterizarea și identificarea unor specii sau genuri.

Fermentația alcoolică, cea mai veche fermentație cunoscută, este efectuată în special de unele levuri, ca *Saccharomyces cerevisiae*, care folosesc calea EMP de degradare a glucozei la piruvat. Prin decarboxilarea piruvatului de către piruvat decarboxilază se formează acetaldehidă, care este redusă la etanol de către alcool dehidrogenază (fig. 38). Studiile de biochimie corobo-

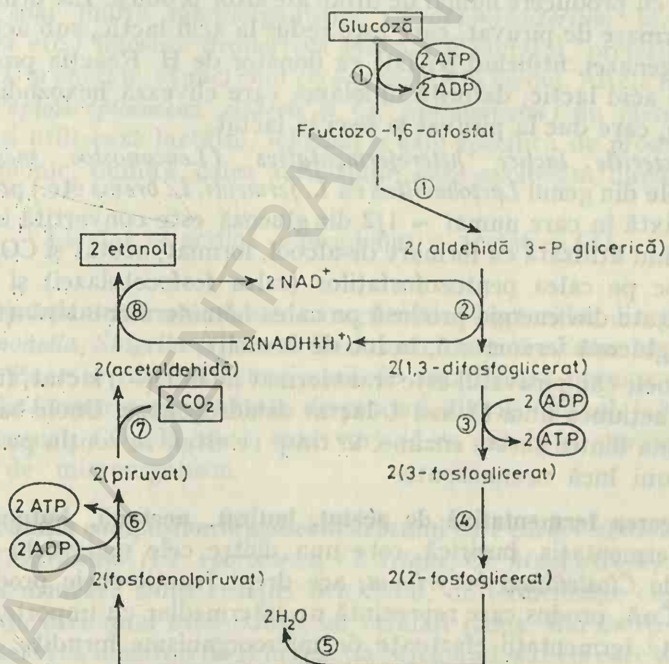


Fig. 38. — Fermentația glucozei la etanol și CO_2 de către levuri. Cheia enzimelor: 1. Enzimele căii Embden—Meyerhof—Parnas. 2. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. 3. 3-fosfoglicerat kinaza. 4. Fosfoglicerat mutaza. 5. Enolaza. 6. Piruvat kinaza. 7. Piruvat decarboxilaza. 8. Alcool dehidrogenaza.

rate cu cele de microbiologie au modificat concepțiile mai vechi referitoare la această levură: utilizarea căii EMP și absența ciclului Krebs funcțional demonstrează că *S. cerevisiae* nu este un microorganism realmente facultativ anaerob; ea crește în condiții de anaerobioză numai cîteva generații.

Fermentația alcoolică poate fi efectuată și de o serie de bacterii ca: *Zymomonas mobilis, Sarcina ventriculi, Erwinia amylovora, Thermoanaerobacter ethanolicus.* Dintre bacterii, cea mai studiată este *Z. mobilis*, care se dezvoltă foarte bine în anaerobioză, utilizînd calea Entner—Doudoroff de metabolizare a glucozei, cu formare de etanol și CO_2. În comparație cu fermentația alcoolică produsă de levuri, producerea de etanol pe cale bacteriană este un proces mai avantajos, deoarece bacteriile cresc mai repede și au o rată de productivitate mult mai mare.

Producerea fermentativă a acidului lactic este efectuată de un grup heterogen de bacterii, care aparțin mai multor genuri, dar care formează două grupuri fiziologice, în funcție de tipul de catabolism al glucozei și de natura produșilor lor finali.

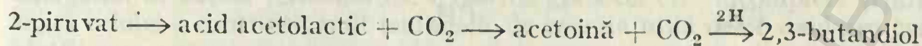
— *Bacteriile lactice homofermentative (Streptococcus lactis, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, L. leichmanii, L. casei, L. plantarum, L. acidophilus, L. jensenii)* fermentează glucoza la acid lactic (glucoză → 2 acid lactic), cu producere numai de urme ale altor produși. Ele urmează calea EMP, cu formare de piruvat, care este redus la acid lactic, sub acțiunea lactat dehidrogenazei, utilizînd NADH ca donator de H. Reacția produce mari cantități de acid lactic, datorită aldolazei, care clivează hexozodifosfatul în triozofosfați, care duc la piruvat și deci la lactat.

— *Bacteriile lactice heterofermentative (Leuconostoc mesenteroides, L. lacti* și cele din genul *Lactobacillus* ca *L. fermenti, L. brevis* etc.) produc o fermentație mixtă în care numai ~ 1/2 din glucoză este convertită la acid lactic, restul fiind utilizată cu formare de alcool, formiat, acetat și CO_2. Fermentația are loc pe calea pentozofosfaților (calea fosfocetolazei) și eliberează numai jumătate din energia produsă pe calea homofermentativă (1 mol ATP per mol de glucoză fermentată, în loc de 2 moli).

În ambele căi, piruvatul este transformat fie în D(—) lactat, fie în L (+) lactat, prin acțiunea unor D- sau L-lactat dehidrogenaze. Unele bacterii conțin numai una dintre aceste enzime, în timp ce altele le conțin pe amîndouă, pentru rațiuni încă necunoscute.

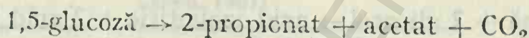
Producerea fermentativă de acetat, butirat, acetonă, butanol și izopropanol. Fermentația butirică este una dintre cele mai vechi cunoscute. Efectuată de *Clostridium butyricum*, are drept reacție-cheie producerea de acetoacetil-CoA, produs care reprezintă un intermediar cu importanță esențială și în alte fermentații efectuate de microorganisme înrudite. Astfel, *Cl. acetobutylicum* produce fermentația acetobutilică a glucozei din care rezultă N-butanol, acetonă, CO_2, H_2 și mici cantități de etanol. Alte tipuri de *Clostridium* determină apariția unor produși diferiți de fermentație, ca acetatul *(Cl. thermoaceticum)* sau izopropanolul.

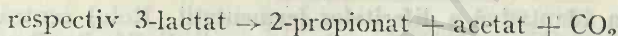
Producerea fermentativă de butandiol. Asociată frecvent cu alți produși finali (ca etanol, acid lactic, acid acetic, CO_2 și H_2), producerea fermentativă de 2,3-butandiol este realizată de o serie de bacterii ca *Enterobacter, Aerobacter, Bacillus, Serratia* după schema:


2-piruvat ⟶ acid acetolactic + CO_2 ⟶ acetoină + CO_2 $\xrightarrow{2H}$ 2,3-butandiol

Formarea de acetoină sau acetilmetil-carbinol ($CH_3-CO-CHOH-CH_3$), pusă în evidență prin testul Voges-Proskauer, are importanță în practica bacteriologică, fiind — în unele cazuri — un caracter cu semnificație pentru identificarea unor specii.

Producerea fermentativă de propionat și succinat. Acizii propionic și succinic sînt produși de fermentație ai glucozei sau ai lactatului, după reacțiile:


1,5-glucoză → 2-propionat + acetat + CO_2


respectiv 3-lactat → 2-propionat + acetat + CO_2

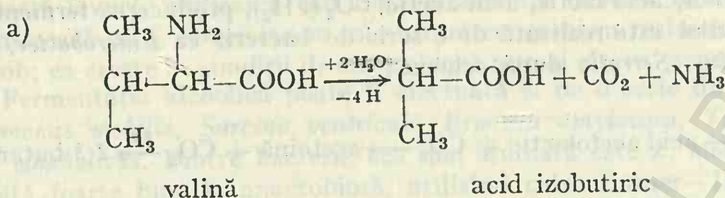
Cele mai multe microorganisme *(Propionibacterium shermanii, P. pentosaceum* etc.) folosesc deopotrivă glucoza și lactatul, preferînd glucoza, ca sursă de C și energie, atunci cînd este prezentă în mediu. Altele însă *(Megasphaera, Peptostreptococcus elsderii* și *Cl. propionicum)* au pierdut această capacitate și utilizează lactatul, folosind o cale specifică de producere a acidului propionic, numită calea acrilatului, care evoluează după schema:


3-lactat → acrilat → propionat + acetat + CO_2

Fermentația acidă mixtă este caracteristică bacteriilor din genul *Escherichia, Salmonella, Shigella* și pare să fie o caracteristică a *Enterobacteriaceae-lor* în general. Ea este rezultatul unei serii de reacții care pornesc de la piruvat și duc la formarea unui număr de produși diferiți (etanol, lactat, acetat, succinat, formiat, CO_2, H_2 etc.), care variază ca natură și cantitate relativă în funcție de microorganism.

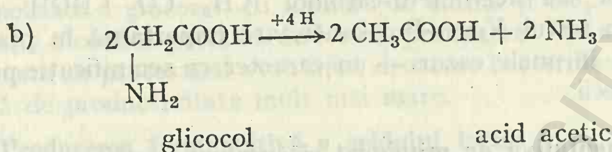
Fermentația compușilor organici ai azotului este caracteristică bacteriilor din genul *Clostridium (Cl. sporogenes, Cl. tetani, Cl. histolyticum).* În forma sa tipică, ea urmează calea reacției Stickland, de fermentație cuplată a doi aminoacizi, în care unul este oxidat, iar celălalt redus. Mai mulți aminoacizi diferiți pot servi ca donatori de H în reacția Stickland, dar cei care participă cel mai frecvent sînt alanina, valina, leucina și izoleucina. Acceptorul de H obișnuit este glicocolul. Un exemplu caracteristic de reacție Stickland este furnizat de fermentația valinei (donator de H) și a glicocolului (acceptor de H), care evoluează în două etape (a și b), a căror sumă formează reacția

globală a fermentației:



a) $$CH_3-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow[-4\,H]{+2\,H_2O} CH_3-CH(CH_3)-COOH + CO_2 + NH_3$$

valină — acid izobutiric



b) $$2\,CH_2(NH_2)COOH \xrightarrow{+4\,H} 2\,CH_3COOH + 2\,NH_3$$

glicocol — acid acetic

Reacția globală:



$$\text{valină} + 2\ \text{glicocol} \rightarrow \text{acid izobutiric} + 2\ \text{acid acetic} + 3\,NH_3 + CO_2$$

Valoarea adaptativă a diferitelor fermentații. Rolul central al căii glicolitice și al piruvatului în foarte multe fermentații diferite, ilustrează unitatea acestor fenomene la nivel molecular și reflectă intervenția principiului evolutiv de selecție a mecanismelor cele mai eficiente posibil. În același timp, marea diversitate a produșilor finali ai diferitelor fermentații reflectă varietatea condițiilor ecologice, care determină selecția diferitelor variante ale mecanismelor fundamentale. Bazele acestei selecții pot fi înțelese dacă se iau în considerație diferitele tipuri de medii oferite de natură, care acționează selectiv, datorită compoziției lor chimice.

Astfel, mustul de strugure, bogat în zahăr, sărac în aminoacizi și ca putere tampon, nu poate fi fermentat mult de bacteriile lactice, care utilizează rapid numeroșii aminoacizi de care au nevoie, îl acidifică repede și mor datorită sensibilității lor la valorile scăzute de pH. De aceea, ele sînt practic dominate de levuri, care, deși cresc mai lent, sînt mai puțin sensibile la mediul acid și sînt, în același timp, mai puțin pretențioase din punctul de vedere al exigențelor nutritive. În schimb, laptele reprezintă un mediu natural ce favorizează creșterea rapidă a bacteriilor respective, dominînd total activitatea levurilor. După Davis și colab. (1969), lucrurile se petrec ca și cum „Natura ar selecționa microorganismele în funcție de o varietate de „talente fermentative", care pot fi comparate cu alergătorii de sprint și cei de cursă lungă".

EFECTUL PASTEUR

Studiind creșterea microorganismelor capabile să folosească alternativ respirația aerobă sau fermentația *(S. cerevisiae)*, în funcție de disponibilitățile de O_2, Pasteur (1861) a făcut observația că, pornind de la aceeași cantitate de glucoză, în prezența oxigenului, se produce o cantitate mult mai mare de celule decît în anaerobioză. De asemenea, în prezența O_2 are loc descreșterea sau blocarea rapidă a procesului de fermentație, scăderea con-

sumului de glucoză şi a producerii de alcool. S-a ajuns la concluzia că „respirația inhibă fermentația", fenomen cunoscut sub denumirea de *efectul Pasteur* sau *efectul oxigenului*.

Ulterior, Stephenson (1949) a demonstrat că randamentul inferior al creşterii în anaerobioză se explică, cel puţin parţial, prin consideraţii de ordin energetic: în cursul fermentaţiei, oxidarea glucozei este incompletă şi furnizează celulei o cantitate mult mai mică de energie utilă decît oxidarea completă, care are loc în prezenţa O_2.

Studiile lui Lynen (1961) au demonstrat, prin măsurarea comparativă a cantităţii de glucoză consumată per gram de celule şi per unitate de timp, că aerobioza reduce foarte mult viteza de consum a glucozei şi inhibă în proporţie de ~ 80% fermentaţia alcoolică a substratului (tabelul nr. 16).

Tabelul nr. 16

Vitezele comparative de utilizare a glucozei de către S. cerevisiae, în aerobioză şi anaerobioză (după Lynen, 1961)

	Q glucozei*)		
	Anaerobioză	Aerobioză	Aerobioză în prezenţa DNF**)
Consumul total de glucoză	3,085	1,950	3,020
Degradarea prin fermentaţie	1,945	0,343	1,387
Degradarea prin respiraţie	—	0,356	0,556
Total glucoză degradată	1,945	0,699	1,943
Asimilare	1,145	1,251	1,077

*) Q glucozei = μ moli de glucoză consumată per mg levură greutate uscată/oră la 25°C.
**) DNF = 2,4-dinitrofenol $4 \cdot 10^{-4}$M.

Pentru explicarea efectului Pasteur au fost propuse mai multe ipoteze: după Rapkine (1938), inhibarea fermentaţiei ar fi rezultatul unei acţiuni directe a O_2 asupra uneia dintre enzimele glicolizei, ca, de exemplu, triozo-P-dehidrogenaza, sau după Engelhardt (1943), fosfofructokinaza. Această ipoteză, susţinută şi azi de unii autori, este infirmată de Lynen (1961), care a demonstrat că efectul Pasteur este suprimat în aerobioză de prezenţa dinitrofenolului (DNF), substanţă cu acţiune specifică de decuplare a fosforilării oxidative, care redă celulelor capacitatea fermentativă chiar în prezenţa aerului (tabelul nr. 16). Este probabil că un factor important în apariţia efectului Pasteur ar fi reprezentat de competiţia pentru precursorii ATP (respectiv pentru ADP şi Pi) între sistemele fosforilării oxidative, pe de

o parte, și glicoliză, pe de alta. Inhibarea fermentației ar fi, după Pye (1965), o consecință a lipsei de P pentru triozo-P-dehidrogenază sau o carență în ADP pentru 3-P-glicerat kinază, enzimă care asigură transferul la ADP, a legăturii macroergice (~) ester fosforic, formată în cursul dehidrogenării triozofosfatului.

După o altă ipoteză, enzimele specifice ale căii glicolizei ar fi inhibate de ATP produs în cursul respirației prin fosforilarea oxidativă. Efectul Pasteur ar fi reglat prin cantitățile relative de NADH și NAD^+, respectiv de ADP și ATP. În prezența O_2, NADH este preluat de sistemul transportorilor de electroni și nu mai este disponibil pentru reducerea piruvatului la alcool. Utilizarea glucozei este inhibată ca urmare a faptului că fosforilarea oxidativă este însoțită de sinteza eficientă de ATP. Aceasta mărește raportul $\frac{ATP}{ADP}$, ceea ce are ca urmare inhibarea activității fosfofructokinazei, care convertește fructozo-6-fosfatul la fructozo-1,6-difosfat. După Vinuella și colab. (1963), fosfokinaza levurii ar fi o proteină allosterică, inhibată de un exces de ATP și activată de AMP.

Concluzia este că în ciuda numeroaselor cercetări efectuate pînă în prezent, efectul Pasteur nu este încă complet elucidat și apare ca un proces complex, la producerea căruia participă mai multe mecanisme, fără a putea preciza importanța lor relativă. Existența lui demonstrează că competiția mai multor enzime pentru același substrat comun poate juca rol în reglarea activităților celulare. Este evident că, în cursul metabolismului celular, numeroasele sisteme enzimatice utilizează aceiași metaboliți pentru scopuri diferite, catabolice sau anabolice. Este probabil că, în anumite condiții fiziologice, aceste sisteme intră în competiție, fapt din care decurg consecințe importante pentru modul de evoluție al activităților fiziologice ale microorganismelor respective (vezi p. 101).

Efectul Crabtree a fost descris în studiile de metabolism ale tumorilor, ca un fenomen de inhibare a activității respiratorii celulare datorită prezenței glucozei în mediu, urmat de metabolizarea fermentativă a acesteia, în condiții de aerobioză. Efectul Crabtree (1929), cunoscut și sub denumirea *de efectul Pasteur invers, inhibiție prin glucoză, inhibiție prin substrat* etc., a fost descris la *S. cerevisiae* și la alte levuri *(Candida* etc.), la care s-a demonstrat că în prezența unor concentrații mari de glucoză, în aerobioză, are loc o inhibare a sintezei citocromilor *a*, *b*, *c* și, ca urmare, represia căilor de respirație celulară. Aceasta afectează metabolismul celular, deoarece NADH acumulat inhibă sistemul piruvat dehidrogenazei și duce la pierderea activității ciclului Krebs. Represia fosforilării oxidative și inhibarea producerii de ATP modifică profund metabolismul glucozei prin afectarea transportului transmembranar al acesteia și ca rezultat limitează consumul ei. Nivelul scăzut al ATP și modificările metabolice complexe ce apar, care limitează, de asemenea, rata consumului glucozei, au drept consecință reducerea cantității de biomasă celulară produsă.

Deși efectul Crabtree este considerat de unii autori ca ilustrînd fenomenul de represie prin catabolit, mecanismul său molecular intim nu este încă cunoscut.

RELAŢIA DINTRE RESPIRAŢIE ŞI FERMENTAŢIE

Unele microorganisme facultativ anaerobe pot face alternativ fie respiraţia, fie fermentaţia aceluiaşi substrat, în funcţie de prezenţa sau absenţa O_2 (fig. 39). Spre exemplu, levurile utilizează aerob glucoza, după reacţia: $C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$ (—688 kcal/mol), iar în anaerobioză produc fermentaţia alcoolică ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2$ (—62,2 kcal).

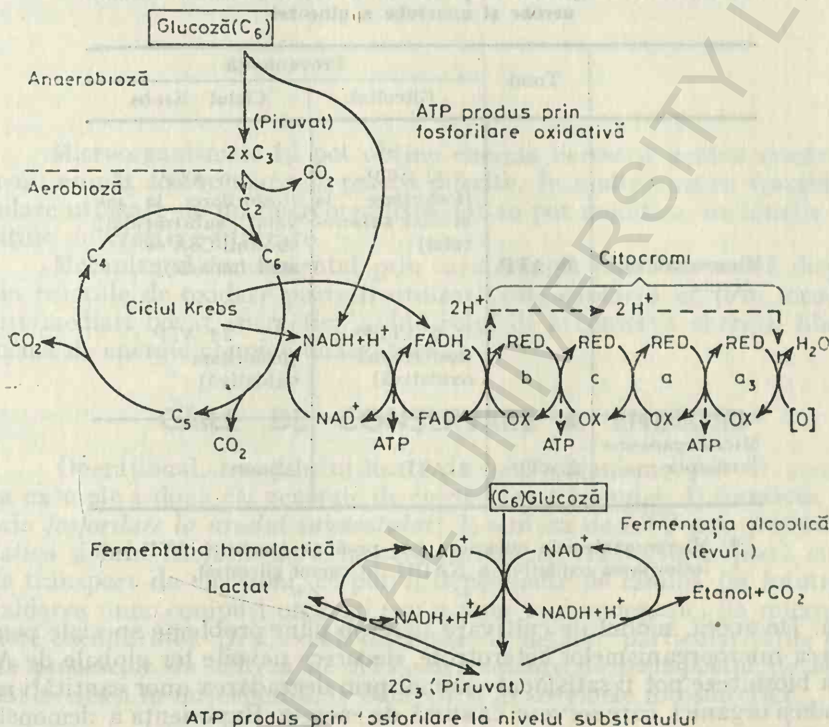


Fig. 39. — Reprezentarea comparativă, schematică, a respiraţiei aerobe, a glicolizei anaerobe şi a fermentaţiei (după Price, 1979).

Aceste date, ca şi bilanţul producerii de ATP, demonstrează că respiraţia aerobă este un proces bun producător de energie: bacteriile aerobe pot forma prin degradarea glucozei 38 de molecule ATP, spre deosebire de anaerobe, care produc numai 2 molecule ATP (tabelul nr. 17).

Dacă luăm în consideraţie faptul că fiecare legătură macroergică din ATP corespunde la 7 kcal/mol, înseamnă că oxidarea glucozei la CO_2 şi H_2O este însoţită de conversia în legături macroergice a 266 kcal. Ţinînd seama de faptul că energia disponibilă prin oxidarea completă a glucozei este de 688 kcal/mol, rezultă că respiraţia are o eficienţă de conversie la ATP de ~ 39 %, restul de energie fiind pierdută sub formă de căldură. Cantitatea de energie eliberată este importantă deoarece determină creşterea efectivă a biomasei celulare.

După Brock (1974), raportat la aceeaşi cantitate de glucoză consumată, levurile formează de 19 ori mai multă masă celulară cînd cresc aerob, decît cînd cresc anaerob. Fermentaţia reprezintă, în comparaţie cu respiraţia, un mod de viaţă energetic costisitor, eliberarea de energie fiind de ~ 10 ori mai mică (— 62,2 kcal/mol de glucoză), iar conversia în ATP foarte

Tabelul nr. 17

Randamentul comparativ al producerii de ATP în cursul oxidării aerobe şi anaerobe a glucozei

	Total	Provenienţă	
		Glicoliză	Ciclul Krebs
Microorganisme aerobe	38 ATP	2 ATP (fosforilare la nivelul substratului)	6 ATP (fosforilare la nivelul substratului; succinil-CoA → acid fumaric)
		6 ATP*) (fosforilare oxidativă)	24 ATP (fosforilare oxidativă)
Microorganisme anaerobe	2 ATP	2 ATP	Absent

*) Microorganismele eucariote pot produce numai 4 ATP prin fosforilarea oxidativă a NADH, în cursul glicolizei.

redusă. De aceea, modul de cultivare anaerob pune probleme speciale pentru creşterea microorganismelor heterotrofe, deoarece nevoile lor globale de ATP pentru biosinteze pot fi satisfăcute numai prin degradarea unor cantităţi mari de produşi organici, care servesc ca sursă de energie. Experienţa a demonstrat că producerea de energie pe cale aerobă necesită o concentraţie relativ mică de O_2 (~ 0,2 %, ceea ce corespunde la ~ 1 % din concentraţia O_2 în atmosferă). Este probabil că respiraţia aerobă a apărut în natură numai cînd această concentraţie a fost atinsă. Sub această concentraţie-prag, procesele aerobe încetează: microorganismele folosesc calea fermentaţiei sau nu cresc deloc şi, în final, mor.

PRODUCEREA ŞI CONSERVAREA ENERGIEI METABOLICE

Microorganismele îşi pot obţine energia necesară pentru creştere printr-un număr foarte mare de reacţii diferite. În multe cazuri, reacţiile particulare utilizate de un microorganism dat se pot modifica, în funcţie de condiţiile de creştere utilizate.

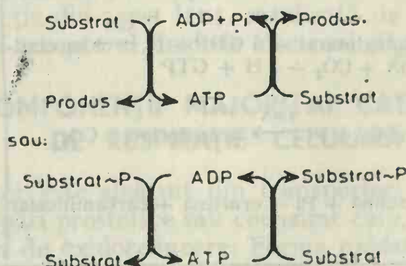
Mecanismul fundamental prin care energia liberă devenită disponibilă din reacţiile de oxidare poate fi utilizată este captarea ei, prin formarea de intermediari bogat energetici, avînd rolul de a conserva energia liberă sub formă de energie chimică de legătură.

CĂILE DE CONSERVARE A ENERGIEI

Operaţional, reacţiile utilizate de microorganisme pot fi considerate ca exemple a două căi generale de conservare a energiei: 1) formarea de ATP prin *fosforilare la nivelul substratului*; 2) sinteza de ATP prin *fosforilare oxidativă* şi prin *fotofosforilare*, în care sinteza de ATP este cuplată cu reacţii de transport de electroni, ce pot fi dependente de lumină (la fototrofe), de oxidarea unor compuşi organici sau a unor ioni anorganici (la microorganismele chemotrofe). Deşi există diferenţe de detaliu, particularităţile generale ale proceselor de sinteză de ATP, dependente de transportul de electroni, sînt aceleaşi în mitocondrii, la bacterii şi în sistemele fotosintetice.

FOSFORILAREA LA NIVELUL SUBSTRATULUI

Acest proces nu implică participarea unui sistem transportor de electroni. Oxidarea unui anumit substrat este urmată de transferul imediat al energiei la o reacţie endergonică, în aşa fel încît ATP este sintetizat şi imediat utilizat, după schemele:



Descoperirea acestui mecanism a avut la bază observația că în procesele metabolice de fermentație, în cursul degradării substraturilor organice, se formează un număr mic de intermediari, ca, de exemplu, 1,3-difosfoglicerat, fosfoenolpiruvat și acetilfosfat, care conțin, fiecare, cîte o legătură macroergică ($\sim$ P). Apariția lor este consecutivă unor reacții de oxidare a substraturilor prezente în mediu — prin pierdere de electroni — însoțită de formarea unei legături $\sim$ între atomul de C oxidat și o moleculă de fosfat anorganic (Pi). Metabolismul acestor compuși organici este cuplat cu transferul grupării $\sim$ P la ADP, printr-o reacție de transfosforilare și formare de ATP după schema:



$$DH_2 + Pi \rightarrow D \sim P + 2\,H^+$$



$$D \sim P + ADP \rightarrow D + ATP$$

Unele dintre aceste reacții ca, de exemplu, cele catalizate de triozofosfat dehidrogenază, fosfocetolază și arginin dihidrolază comportă o fosforilare directă a substratului în timpul oxidării. În multe cazuri însă, energia eliberată este inițial conservată în compuși „bogat energetici", care acționează ca intermediari, cum ar fi: acetil-CoA, acetilfosfat etc. sau ca în sistemul α-cetoglutarat dehidrogenazei, în care acceptorul imediat al fosfatului, guanozindifosfatul (GDP), este fosforilat la GTP, pentru a ceda ulterior gruparea $\sim$ P la ADP, cu formare de ATP.

Aceste modalități de sinteză a ATP sînt cunoscute sub denumirea de *fosforilare la nivelul substratului* și decurg, după Haddock și Jones (1977), după modelul a două tipuri de reacții generale distincte:

1) ADP + substrat $\sim$ P $\rightleftharpoons$ ATP + substrat

2) ADP + Pi + substrat X $\rightleftharpoons$ ATP + substrat + X

Tabelul nr. 18

Principalele exemple de reacții oxidative însoțite de o fosforilare la nivelul substratului întîlnite la microorganisme

Metabolismul	Reacția	Enzima specifică
GLUCIDE		
Glicoliza	Triozofosfat + Pi $\rightarrow$ 1,3-difosfoglicerat + + 2 H	Triozofosfat dehidrogenaza
Calea pentozofosfatului	Pentozofosfat + Pi $\rightarrow$ acetilfosfat + triozofosfat	Fosfocetolaza
ACETAT		
Ciclul acizilor tricarboxilici	α-cetoglutarat + 6 GDP + Pi $\xrightarrow{CoA}$ succinil-CoA + CO_2 + 2 H + GTP	α-cetoglutarat dehidrogenaza
PIRUVAT	Piruvat + Pi $\xrightarrow{CoA}$ acetilfosfat + CO_2	„Reacția fosforoclastică"
ARGININĂ	Citrulină + Pi $\rightarrow$ ornitină + carbamilfosfat	Sistemul arginină—dihidrolază

Numărul reacţiilor de acest tip identificate pînă în prezent este relativ mic, iar desfăşurarea lor este catalizată de enzime solubile în citoplasmă (tabelul nr. 18).

FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Fosforilarea prin transfer de electroni sau oxidativă este procesul prin care cea mai mare parte din energia eliberată în cursul oxidării metaboliţilor pe calea ciclului acizilor tricarboxilici este înmagazinată sub formă de ATP. Spre deosebire de fosforilarea la nivelul substratului, în acest caz, sinteza de ATP este cuplată cu reacţiile de transport de electroni, prin care oxidarea unor compuşi organici (la organoheterotrofe) sau a unor ioni anorganici (la chemolitotrofe) cu potenţial redox negativ este legată cu reducerea unor acceptori de electroni, cu potenţial redox mult mai pozitiv. Descrisă iniţial pe sistemele mitocondriale, sinteza de ATP dependentă de transferul de electroni are, în esenţă, acelaşi mecanism şi la bacteriile aerobe, reflectînd, probabil, originea bacteriană a mitocondriilor.

MECANISMELE MOLECULARE ALE FOSFORILĂRII OXIDATIVE

După cum am arătat, ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs), include o serie de reacţii, prin care piruvatul este oxidat la CO_2 şi apă. El serveşte ca o cale centrală pentru biosinteze şi respiraţie celulară, respectiv, pentru producerea de precursori anabolici şi energie. Ionii de H^+ şi electronii eliberaţi de la substraturile supuse oxidării, în cursul desfăşurării ciclului Krebs, sînt combinaţi în cursul respiraţiei aerobe cu oxigenul molecular din aer, cu formare de apă. Considerată iniţial ca limitată numai la microorganismele fototrofe şi la cele chemotrofe aerobe, sinteza de ATP pe calea fosforilării prin transport de electroni a fost descrisă şi la multe bacterii anaerobe (Decker, Jungermann şi Thauer, 1970, 1977).

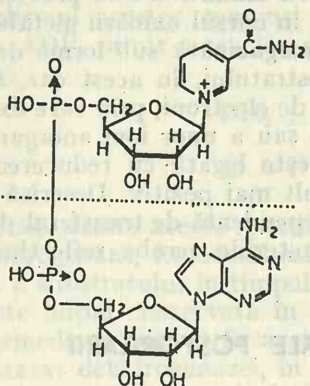
Transferul ionilor de hidrogen nu se face direct la O_2, ci, împreună cu electronii însoţitori, ei sînt transportaţi, prin intermediul unei serii de molecule-purtător, care alcătuiesc un adevărat sistem de tranzit al electronilor. Unele molecule-purtător, ca, de exemplu, flavoproteinele (FMN şi FAD) şi chinonele (ubichinona), sînt specializate în transportul atomilor de H (transport simultan de electroni şi protoni), în timp ce altele, în special citocromii şi proteinele FeS, transportă numai electroni. Procesul global este numit respiraţie, iar purtătorii de hidrogen şi purtătorii de electroni din membranele celulare formează *lanţul respirator* sau *catena de respiraţie celulară.* Numai în ultima reacţie din acest lanţ, catalizată de citocromoxidază, ionii de H^+ se combină cu acceptorul final de electroni (O_2).

COMPONENŢII MAJORI AI CATENEI DE RESPIRAŢIE CELULARĂ

Lanţul respirator este alcătuit din transportori de electroni, proteine enzimatice avînd grupări prostetice sau coenzime care, fiecare în parte, funcţionează ca un sistem de oxidoreducere. Forma oxidată a fiecărei coenzime

poate fi deosebită de cea redusă, datorită spectrului său de absorbţie diferit. După natura lor chimică şi ordinea în care intră în acţiune, componenţii catenei de respiraţie celulară sînt grupaţi în cinci categorii:

1) **Dehidrogenazele piridinice** sînt oxidoreductaze care catalizează reacţii de oxidoreducere prin transfer de hidrogen ($H^+ + e^-$) — transhidrogenaze — de la un substrat donator la un substrat acceptor. Coenzimele lor sînt NAD^+ („Nicotinamid Adenin Dinucleotid") şi $NADP^+$ („Nicotinamid Adenin Dinucleotid-fosfat"), care pot exista în formă oxidată (NAD^+, $NADP^+$) sau redusă ($NADH + H^+$, $NADPH + H^+$). Frecvent, în mod convenţional, sînt scrise ca $NADH_2$, respectiv $NADPH_2$.



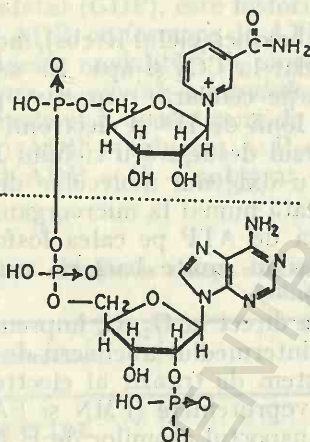


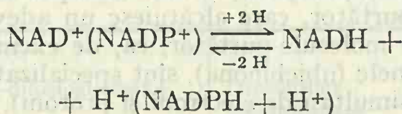
Fig. 40. — Structura NAD^+ şi $NADP^+$.

NAD^+, numit iniţial *difosfopiridinnucleotid*, are formula nicotinamid-P-P-riboză-adenină, fiind format din două nucleotide (acid adenilic (AMP) şi nicotinamidribotid), legate printr-o grupare fosfat.

$NADP^+$, numit iniţial *trifosfopiridinnucleotid*, are o structură identică şi o grupare fosfat adiţională, legată de una din moleculele de riboză (C_2') (fig. 40).

Piridinnucleotidele reprezintă principalul intermediar între ciclul acizilor tricarboxilici şi enzimele membranare ale fosforilării oxidative care participă în respiraţie şi au două funcţii esenţiale:

1) *Funcţia catalitică*, de coenzime ale unor dehidrogenaze, decurge din capacitatea lor de a suferi uşor reacţii de oxidoreducere reversibile, avînd ca sistem activ gruparea nicotinamidă, după schema:



$$NAD^+(NADP^+) \underset{-2H}{\overset{+2H}{\rightleftharpoons}} NADH + H^+(NADPH + H^+)$$

Formele oxidate au un atom de H în minus şi o sarcină pozitivă la atomul N. Datorită acestui fapt, NAD^+ acceptă doi electroni şi un proton pentru a forma NADH: un electron neutralizează sarcina pozitivă pe atomul de N, iar al doilea se combină cu un proton pentru a hidrogena un atom de C. Protonul (H^+) necesar pentru echilibrarea reacţiei este eliberat ca atare în mediu. Prin această funcţie, piridinnucleotidele asigură transferul de putere reducătoare de la metabolismul producător de energie la reacţiile de biosinteză, mediind astfel reacţiile biosintetice reductive.

2) Cea de-a doua funcţie, intim corelată cu prima, este aceea de compus macroergic, observată frecvent în cursul metabolismului respirator, cînd o mare parte din piridinnucleotidele formate prin oxidarea substanţelor organice sînt folosite pentru a genera ATP.

Procesul de oxidare a NADH (sau NADPH) este o reacţie exergonică, în cursul căreia se produce o diferenţă de potenţial ($\Delta E_0' = 1,14$ v), care este folosită pentru sinteza de ATP ($NADH + H^+ + 1/2\, O_2 \xrightarrow{2e^-} NAD^+ + H_2O +$ energie). Datorită faptului că fluxul electronilor de la NADH generează o stare energizată a constituenţilor lanţului respirator, reoxidarea unei molecule de piridinnucleotide produce suficientă energie pentru a permite — în condiţii optime — formarea a trei molecule de ATP de la ADP, prin transportul de electroni în condiţii de oxibioză.

Unele reacţii de metabolism necesită în mod specific fie NAD^+, fie $NADP^+$, dar în termenii metabolismului general, cele două tipuri de molecule-purtător sînt adesea echivalente, deoarece o anumită enzimă — transhidrogenaza — poate media transferul reversibil de electroni între ele:



$$NADPH + H^+ + NAD^+ \rightleftharpoons NADP^+ + NADH + H^+.$$

2) **Oxidoreductazele flavinice** (flavinenzimele sau dehidrogenazele flavinice) sînt flavoproteine capabile să medieze reacţii reversibile de oxido-reducere. Partea lor activă (porţiunea flavinică) este reprezentată de o grupare prostetică de culoare galbenă, derivat de biosinteză al riboflavinei (vitamina B_2), corespunzînd coenzimelor FMN („Flavin Adenin Mononucleotid") şi FAD („Flavin Adenin Dinucleotid"), strîns legate de componentele proteice respective. FMN, gruparea prostetică a FMN-dehidrogenazei din lanţul respirator, este alcătuită dintr-un ciclu izoaloxazinic legat de ribitol (alcool deri-

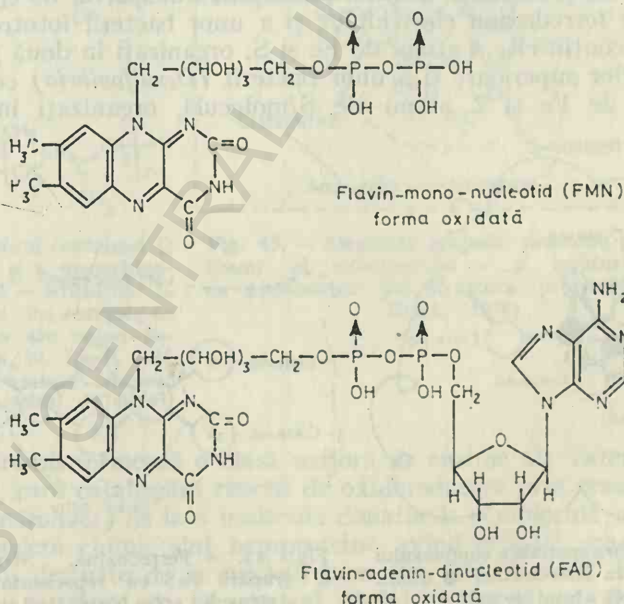
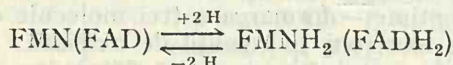


Fig. 41. — Structura FMN şi FAD.

vat de la riboză). FAD are funcţia de coenzimă a mai multor enzime cu importanţă în metabolism (spre exemplu, succinat dehidrogenaza conţine FMN, legat de adenină şi riboză, printr-un al doilea fosfat, fig. 41).

Potențialul redox (E_0') al coenzimelor izolate este diferit de cel al flavoproteinelor respective, deoarece interacțiunea proteinelor cu grupul prostetic face E_0' mai pozitiv sau mai negativ. Cele două coenzime pot exista sub formă oxidată (FMN și FAD) sau redusă ($FMNH_2$ și $FADH_2$). Această comportare este consecința funcției lor specifice de a transfera reversibil doi atomi de hidrogen ($2e^- + 2H^+$) după reacția:



$$FMN(FAD) \underset{-2H}{\overset{+2H}{\rightleftharpoons}} FMNH_2\,(FADH_2)$$

3) **Proteinele FeS** (proteine cu fier non-hem) au un rol important în lanțul respirației celulare, datorită funcției lor de transportori de electroni cu potențial scăzut ($E_0' \sim 0{,}41$ v). Una dintre cele mai cunoscute, *ferredoxina*, descoperită de Mortenson și colab. (1962) la *Clostridium pasteurianum* are masa moleculară ~ 6 000 dal și o structură caracteristică a situsului catalitic (ca o „colivie") în care sarcinile electronilor sînt distribuite între cei opt atomi de Fe și opt atomi de S/moleculă, aranjați sub forma a două grupuri FeS în formă de cub (fig. 42). Atomii de Fe sînt legați de radicalii aminoacidului cisteină și interconectați prin legături sulfurice. Din cei opt atomi de S, unii sînt de tipul S^{2-}, iar ceilalți aparțin cisteinei. Situsul activ al ferredoxinei este format din 2 atomi de Fe și 2 atomi de S, numiți labili deoarece sînt eliberați sub formă de H_2S, după acidifierea soluțiilor de Fe (fig. 43); deși atomii de Fe nu sînt legați de un nucleu porfirinic, ca în cazul citocromilor, ei pot să-și schimbe valența, permițînd transportul de electroni. Spre deosebire de ferredoxina clostridiilor și a unor bacterii fototrofe *(Chromatium)*, care conțin cîte 8 atomi de Fe și S, organizați în două grupuri FeS, cea a plantelor superioare și a unor bacterii *(Desulfovibrio)* conține numai cîte 2 atomi de Fe și 2 atomi de S/moleculă, organizați într-un singur grup FeS.

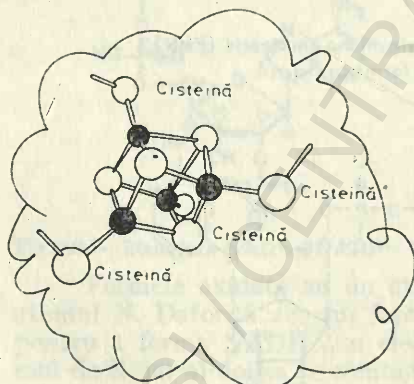


Fig. 42. — Structura spațială a complexului FeS din structura ferredoxinei ● atomi de fier; O atomi de sulf.

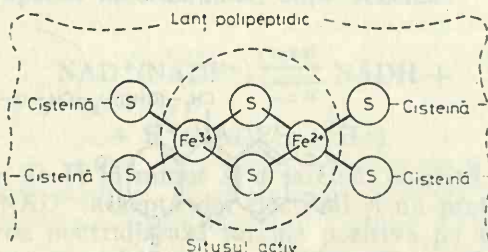
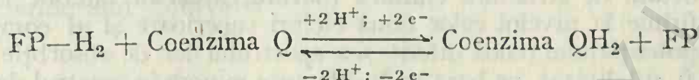


Fig. 43. — Ferredoxina. Structura spațială a grupării FeS cu reprezentarea schematică a situsului activ (după Hall și Rao, 1977).

4) **Coenzimele Q sau chinonele** sînt substanțe care funcționează ca acceptori de hidrogen. Derivate de la benzochinonă ele au un lanț lung, format din 4—10 unități izopren. Reprezentantul lor tipic în mitocondrii este ubichinona, numită astfel datorită răspîndirii sale în toate celulele. Ea are 10

unități izopren la celulele animale ($CoU\,Q_{10}$), 6 la levuri ($CoU\,Q_6$) și un număr diferit la alte microorganisme. Ubichinona este o moleculă-transportor cu structură ciclică, avînd două grupări $>C = 0$ și trei stări posibile de existență: forma complet oxidată (Q), forma semioxidată sau semichinona ($OH^{\bullet}$) și forma complet redusă (QH_2). În catena de respirație celulară funcționează ca o coenzimă (CoU Q) cuplată cu o proteină, îndeplinind funcția de intermediar între dehidrogenazele flavinice (FP) și citocromi, după reacția:



$$FP{-}H_2 + \text{Coenzima } Q \underset{-2H^+;\ -2e^-}{\overset{+2H^+;\ +2e^-}{\rightleftharpoons}} \text{Coenzima } QH_2 + FP$$

Celulele bacteriene conțin adeseori chinone adiționale (ca, de exemplu, menachinona la *E. coli*), avînd o structură chimică diferită (fig. 44).

Foarte asemănătoare ubichinonei este *plastochinona*, purtător de hidrogen din cloroplaste, activă în fotosinteză.

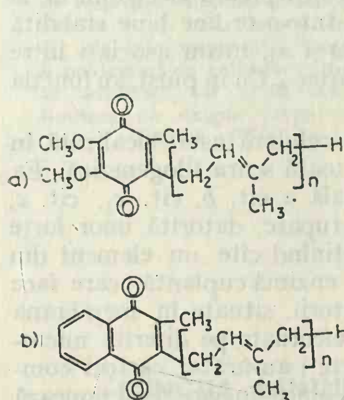


Fig. 44. — Structura coenzimei Q (ubichinona) (a) și a menachinonei (b). Cercurile = situsurile la nivelul cărora au loc reacțiile de oxidoreducere; *n* are valori cuprinse între 4 și 10. La *E. coli*, n = 8, pentru ambele chinone (după Gottschalk, 1979).

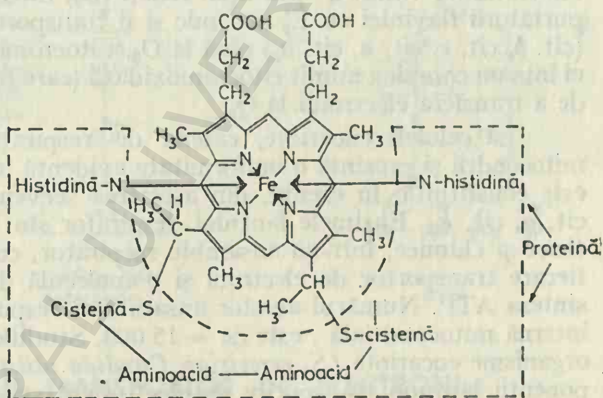
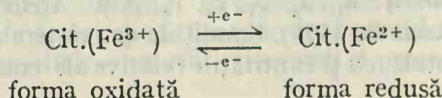


Fig. 45. — Structura grupului prostetic porfirinic (hem) al citocromului *c* și legăturile sale cu aminoacizii din structura proteinei. (după Brock, 1976).

5) **Citocromii** formează o clasă majoră de enzime ale catenei de respirație celulară, care catalizează reacții de oxidoreducere prin transfer de electroni *(transelectronaze)* de la o moleculă donator la o moleculă acceptor. Din punctul de vedere chimic sînt hemproteine, avînd grupări prostetice active (fier-porfirină), derivate de la nucleul hem (fig. 45), format dintr-un ciclu tetrapirolic, cu un atom de Fe central chelat în interiorul ciclului, avînd capacitatea de a reduce și oxida alternativ, după reacția:



$$\underset{\text{forma oxidată}}{Cit.(Fe^{3+})} \underset{-e^-}{\overset{+e^-}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{forma redusă}}{Cit.(Fe^{2+})}$$

Citocromii sînt dispuși în catena de respirație celulară într-o ordine definită, determinată de potențialul lor redox, iar electronii eliberați din protonizarea hidrogenului ($H \rightarrow H^+ + e^-$) sînt trimiși succesiv în secvența respectivă. Implicarea în respirația celulară — după descoperirea lor la levuri — s-a făcut ținînd seama de modificarea spectrelor de absorbție, în condiții de mediu corespunzînd stării oxidate și reduse.

Citocromii sînt grupați în trei clase principale: cit. *a*, cit. *b* și cit. *c*, pe baza unor detalii de structură chimică (natura catenelor laterale legate de nucleul porfirinic la nivelul celor două cicluri superioare și al componentei proteice), a potențialului redox diferit și a spectrului lor de absorbție. Fiecare grup poate fi subdivizat, pe baza unor diferențe minore în spectrul de absorbție, în subgrupuri (c și c_1 sau a și a_3).

Citocromii pot exista în stare oxidată sau redusă, în funcție de starea atomului de Fe din structura lor, care poate fi oxidat reversibil (Fe^{3+}, feric) sau redus (Fe^{2+}, feros), prin cîștigarea sau pierderea unui electron. Diferiții citocromi au valori de potențial redox (E_0') diferite. Ei preiau electronii de la purtătorii flavinici cu E_0' mai mic și îi transportă într-o ordine bine stabilită (cit. *b*, cit. *c*, cit. *a*, cit. a_3) pînă la O_2. Citocromii a și a_3, intim asociați între ei într-un complex numit citocromoxidază (care conține 2 Cu în plus), au funcția de a transfera electronii la O_2.

La celulele eucariote, catena de respirație celulară este localizată în mitocondrii și prezintă o uniformitate evidentă în toată scara filogenetică. Ea este constituită, în esență, din asocierea secvențială a cit. *b*, cit. c_1, cit. *c*, cit. *a*, cit. a_3. Enzimele lanțului respirator sînt grupate, datorită unor forțe fizice și chimice, într-un ansamblu respirator, conținînd cîte un element din fiecare transportor de electroni și o moleculă de enzimă cuplantă, care face sinteza ATP. Numărul acestor ansambluri respiratorii, situate în membrana internă mitocondrială , este de ~ 15 000. Studiile efectuate pe diferite microorganisme eucariote (*S. cerevisiae*, *Candida utilis* etc.) au arătat că toți componenții lanțului transportor de electroni și succesiunea în care funcționează sînt similare, deși nu identice cu cei din mitocondriile celulelor animale.

Citocromii bacterieni. Toate bacteriile strict aerobe și majoritatea celor facultativ anaerobe conțin citocromi, localizați în membrana plasmatică și în invaginările ei, de tipul mezosomilor, din care pot fi eliberați după dezintegrare prin șoc osmotic, tratare cu ultrasunete sau după formarea de protoplaști sau sferoplaști.

Citocromii bacterieni prezintă o mare variabilitate în ceea ce privește structura, funcțiile și condițiile lor de existență. Unii sînt similari celor descriși la eucariote, în timp ce alții sînt caracteristic bacterieni. În celulele intacte, benzile de absorbție sînt rezultatul prezenței mai multor citocromi diferiți, fiecare avînd propria sa bandă de absorbție. Ei se asociază diferit, putînd forma o mare varietate de combinații, variabile de la o specie bacteriană la alta, ca, de exemplu: *B. subtilis*: a, a_3, b, c, c_1; *E. coli*: b_{556}, d sau b_{558}, o; *Micrococcus lysodeikticus*: b, c, aa_3 sau b,c,o; *Paracoccus denitrificans*: b, c, aa_3; *Azotobacter vinelandii*: a_1, a_2, b_1, c_4, c_5, o și *Acetobacter paraoxydans*: a_1, a_2, a_4, b, c, c_1 (Gottschalk, 1979). Condițiile de creștere ale bacteriilor afectează atît cantitatea totală, cît și cantitățile relative ale componenților lanțului citocromic.

În general, structura lanțului transportor de electroni la bacterii este mai complexă decît la alte organisme, deoarece poate conține sisteme transportoare suplimentare și, în plus, poate avea o structură ramificată. Spre deosebire de lanțul respirator mitocondrial al mamiferelor, care are o structură lineară bidimensională aproape neramificată, lanțul respirator bacterian are o structură tridimensională, fiecare component putînd avea mai mult decît o „intrare" și o „ieșire" din lanț (fig. 46). Căile ramificate terminale ale lanțului respirator sînt folosite în grade diferite, în funcție de condițiile în care bacteriile sînt cultivate.

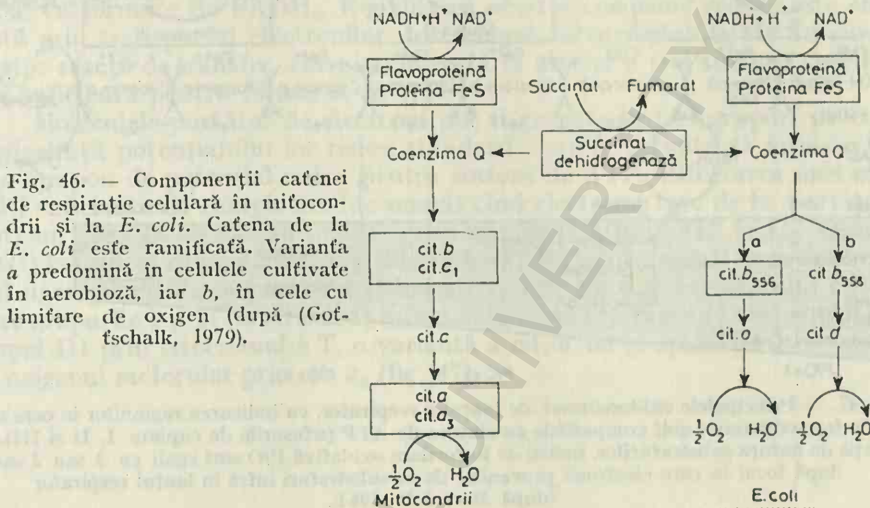


Fig. 46. — Componenții catenei de respirație celulară în mitocondrii și la *E. coli*. Catena de la *E. coli* este ramificată. Varianta *a* predomină în celulele cultivate în aerobioză, iar *b*, în cele cu limitare de oxigen (după (Gottschalk, 1979).

FUNCȚIA LANȚULUI TRANSPORTOR DE ELECTRONI

Purtătorii de electroni din catena de respirație celulară participă la o serie de reacții cu valori E_0' treptat crescînde, interpuse între substratul dehidrogenării inițiale (care are de regulă o valoare E_0' negativă) și reducerea terminală a O_2 (care are o valoare E_0' pozitivă). Deși energia este eliberată pe fiecare treaptă a transferului de electroni, diferența dintre valorile E_0' este suficient de mare pentru a putea fi legată eficient cu sinteza ATP de la ADP, de regulă numai cu trei situsuri specifice de fosforilare de-a lungul lanțului transportor de electroni. Cele trei situsuri corespund reacțiilor de dehidrogenare a NADH, de oxidare a cit. *b* și de oxidare a cit. *a*. În celelalte situsuri de-a lungul lanțului, energia eliberată în timpul transferului este pierdută sub formă de căldură. Moleculele-transportor ale catenei de respirație celulară sînt încorporate în matricea unei membrane, ca, de exemplu, membrana internă mitocondrială la celulele eucariote sau membrana plasmatică și, în oarecare măsură, structurile derivate din ea, cum sînt mezosomii. Unele molecule-purtător, ca, de exemplu, flavoproteinele și coenzima Q (ubichinonele, menachinona etc.), sînt specializate în transportul atomilor de hidrogen ($H^+ + e^-$), în timp ce altele, cum sînt citocromii și proteinele FeS, transportă electroni.

Componenţii majori ai lanţului respirator sînt organizaţi secvenţial în ordinea crescîndă a potenţialului lor redox. Datorită acestui fapt, electronii sînt transferaţi de-a lungul lanţului, în mod treptat, de la componenţii cei mai electronegativi spre oxigen (mult mai electropozitiv). Potenţialul redox al unui component al lanţului respirator este un indicator al poziţiei sale relative în cadrul lanţului. Figura 47 prezintă sintetic ansamblul reacţiilor cuplate ale oxidării celulare şi situsurile la nivelul cărora are loc procesul de fosforilare. Numărul de molecule de ADP fosforilate per atom de oxigen este

Fig. 47. — Principalele oxidoreduceri ale lanţului respirator, cu indicarea regiunilor în care condiţiile termodinamice sînt compatibile cu sinteza de ATP (situsurile de cuplare I, II şi III). În funcţie de natura substraturilor, indicii de fosforilare oxidativă P/O sînt egali cu 3 sau 2 sau 1, după locul în care electronii provenind de la substraturi intră în lanţul respirator (după Berkaloff, 1981).

exprimat ca raport **P**: **O***). În lanţul mitocondrial, ca şi la sistemele bacteriene aerobe acest raport este **P**: **O** = 3, corespunzînd sintezei de 3 molecule de ATP la nivelul situsurilor specifice pentru fiecare moleculă de NADH oxidată. La *E. coli*, raportul **P**: **O** = 2, cele două situsuri fiind reprezentate, probabil, de dehidrogenarea NADH şi de oxidarea unui citocrom.

Microorganismele, ca şi celelalte organisme, au dezvoltat un sistem atît de complex pentru reacţia simplă dintre NADH şi O_2, pentru a asigura eliberarea treptată a energiei şi utilizarea ei eficientă, cu pierderi minime, pentru formarea de ATP. Eliberarea într-o singură treaptă ar fi ineficientă, deoarece cea mai mare parte din energie s-ar pierde sub formă de căldură, determinînd distrugerea celulelor.

Deşi este foarte mult studiat, mecanismul molecular al fosforilării oxidative nu este încă complet elucidat, fapt care explică unele contradicţii din literatura de specialitate. Cunoştinţele actuale provin, în special, din studii efectuate pe fragmente izolate de sisteme membranare sau pe organite (mitocondrii) şi celule intacte, fapt care face ca reconstituirea etapelor interme-

*) Indicele de fosforilare oxidativă **P**: **O** este dat de raportul dintre numărul de molecule de fosfat utilizate pentru fosforilarea ADP, faţă de numărul de molecule de oxigen consumate. Valoarea acestui indice depinde de situsul în care electronii substratului intră în lanţul respirator, situs care diferă în funcţie de natura substratului.

diare — în lipsa posibilității de fracționare completă a sistemelor — să fie în unele cazuri controversată. După cum am arătat, în cursul ciclului acizilor tricarboxilici care asigură oxidarea completă a unei molecule de substrat se produc patru reacții de dehidrogenare prin care sînt eliberați cîte 2 H^+ (respectiv 2 e^-), ce sînt cuplați cu catena de respirație celulară. În trei reacții, NAD^+ servește ca acceptor de $H(H^+ + e^-)$ pentru dehidrogenazele specifice care oxidează izocitratul, α-cetoglutaratul și malatul, cu formarea, la fiecare ciclu de reacție, a 3 ($NADH + H^+$). În reacția a patra, electronii proveniți de la succinat sînt acceptați de succinic dehidrogenază, care este o flavoproteină, cu formare de $FADH_2$. Reoxidarea acestor coenzime reduse este efectuată prin transportul electronilor de-a lungul catenei pînă la O_2. În cursul acestor reacții de transfer, energia eliberată la nivelul a trei situsuri specifice este suficientă pentru formarea de ATP.

Moleculele-purtător de electroni pot fi grupate în trei grupuri pe baza similarității potențialului lor redox standard, care le permite să formeze un stoc-tampon de potențial redox pentru sinteza de ATP. Eliberarea unei cantități suficiente de energie are loc numai cînd electronii trec de la purtătorii dintr-un grup la purtătorii din alt grup sau de la grupul III la O_2. Chance (1971) consideră că purtătorii din diferitele grupuri sînt cuplați prin intermediul unor purtători cu potențial redox alternant. Natura purtătorului cuplat între grupurile I și II (la situsul I) nu este cunoscută. Grupul II este cuplat cu grupul III prin citocromul *b* T, o variantă a cit. *b*, iar grupul III este cuplat cu oxigenul molecular prin cit. a_3 (fig. 47).

MECANISMELE TRANSFERULUI DE ENERGIE ÎN CELULE PE CALEA ATP

"Deși teoria chemiosmotică a transformat premisele de bază ale cercetării membranelor, atitudinea comunității microbiologice față de ea este de perplexitate și de lipsă de înțelegere plină de admirație"

F. M. Harold

Una dintre problemele fundamentale ale bioenergeticii celulare este explicarea mecanismelor prin care energia eliberată în cursul metabolismului este stocată sub formă de ATP, precum și modul în care se realizează cuplarea energetică în cazul diferitelor funcții dependente de consum de energie. În acest scop au fost propuse mai multe ipoteze.

Ipoteza cuplării chimice (Slater, 1953) consideră că energia eliberată prin transferul de electroni ar fi convertită direct în energie chimică sub forma unui intermediar sau a unui precursor al ATP. În cazul unei reacții de oxidoreducere (de exemplu, A red. → B oxid.), energia eliberată este utilizată pentru a converti un intermediar I de la o „energie joasă" la o stare „energizată", de compus chimic „macroergic", comun tuturor reacțiilor de acest gen, care, la rîndul său, ar asigura sinteza de ATP (fig. 48). Pînă în prezent

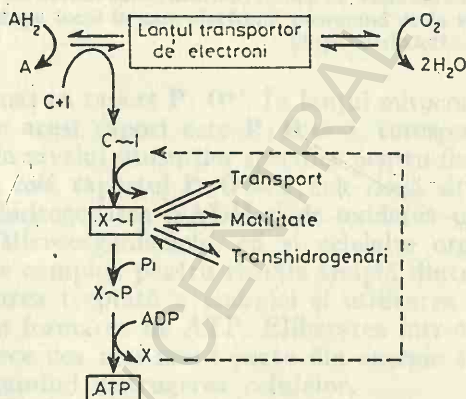


Fig. 48. — Ipoteza cuplării chimice a energiei eliberate în cursul fosforilării oxidative.

însă, nu a fost izolat nici un intermediar I și nici un complex macroergic ~ I și, de asemenea, nici nu au fost evidențiate urme ale prezenței lor, presupunînd că ar fi compuși instabili. Ipoteza nu explică dependența absolută a sintezei de ATP de existența unor sisteme membranare închise.

Ipoteza modificărilor conformaționale sau mecanochimică (Boyer, 1960, 1974; Green, 1967) consideră că energia eliberată din reacțiile de oxidare este utilizată inițial pentru a face un „lucru mecanic", ca, de exemplu, modificarea conformațională a unor purtători de electroni, respectiv transducția potențialului de oxidoreducere în energie conformațională. Purtătorii „energi-

zaţi" induc modificări conformaţionale în factorii de cuplare asociaţi, probabil prin intermediul proteinelor. Revenirea de la starea „încordată" la normal s-ar însoţi de formarea concomitentă de ATP: tranziţia purtătorului energi-

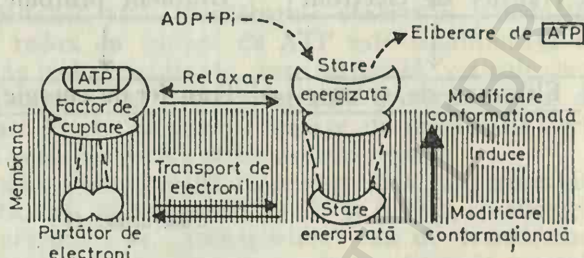


Fig. 49. — Model de sinteză a ATP, în acord cu ipoteza cuplării conformaţionale, bazat pe forma originară a ipotezei, emisă de Boyer (după Evans, 1977).

zat C* (engl. carrier = purtător) la starea normală „relaxată" C ar avea loc numai în prezenţa ADP şi a Pi şi ar determina modificarea conformaţională a ATP-azei, a cărei relaxare ar dirija sinteza de ATP (Garland, 1975). Existenţa modificărilor conformaţionale a fost demonstrată în cazul mai multor componenţi ai lanţului de transport mitocondrial, dar nu se ştie dacă acestea reprezintă mecanismul cuplării reacţiilor de transfer ale electronilor cu fosforilarea (Baltschefsky, 1974). Ipoteza modificărilor conformaţionale reprezintă, în esenţă, un caz particular al ipotezei cuplării chimice (fig. 49).

Ipoteza chemiosmotică, emisă în forma sa iniţială de Mitchell (1961) şi îmbogăţită pe măsura acumulării de date experimentale, consideră că cuplarea dintre reacţiile producătoare de energie ale respiraţiei şi reacţiile care conservă, transformă şi consumă energia se realizează ca o consecinţă a instalării unei stări intermediare macroergice, consecutivă unui schimb de electroni (e^-) şi protoni (H^+), respectiv de ioni negativi şi pozitivi, între cele două părţi (internă şi externă) ale membranelor care conţin lanţul respirator (tabelul nr. 19).

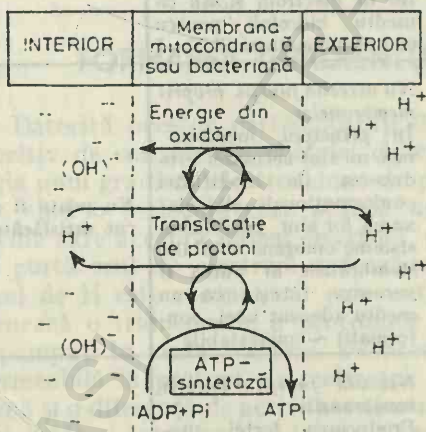
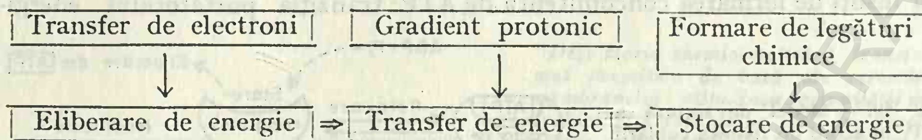


Fig. 50. — Principiul general al teoriei chemiosmotice. Transferul electronilor prin lanţul respirator este asociat cu translocaţia de H^+ în afara membranei. Deoarece membrana este impermeabilă la protoni, aceştia se acumulează în afara ei, creînd o diferenţă de potenţial electrochimic, utilizată pentru a dirija sinteza de ATP (după Harper, 1977).

În felul acesta, energia eliberată în respiraţie (fosforilarea oxidativă) sau fotosinteză (fotofosforilare) este stocată iniţial sub forma unui gradient de protoni răspunzător de sinteza de ATP, care leagă metabolismul producător de energie de efectuarea unor activităţi chimice (transport activ, biosinteze etc.), iar la bacterii chiar de unele activităţi mecanice (mişcarea flagelilor, fig. 50)

după schema:



Tabelul nr. 19

Principalele particularități ale ipotezelor privind conservarea energiei, în cursul procesului de fosforilare oxidativă (modificat după Thauer, Jungermann și Decker, 1977)

Ipoteza	Tipul de intermediar macroergic	Exigențe structurale pentru producere	Modul de acțiune a factorilor decuplanți
Cuplarea chimică	X ~I Compus cu potențial înalt de hidroliză format în cursul reacțiilor redox ale transportului de electroni	*Nu necesită funcții proprii membranelor.* În principiu, membranele nu sînt necesare. Reacțiile sînt posibile în sisteme omogene solubile, ca și fosforilarea la nivelul substratului. Membranele pot fi necesare, totuși, pentru aranjarea organizată a componenților lanțului transportor de electroni și/sau ca mediu hidrofob pentru compusul metastabil X~I	Nu poate fi explicat satisfăcător
Cuplarea conformațională (mecanochimică)	~Conformațională Conformație macroergică a constituenților proteici indusă de reacțiile redox ale transportului de electroni	*Nu necesită funcții proprii membranelor.* În principiu, membranele nu sînt necesare. Producerea de modificări conformaționale și relaxarea lor sînt posibile în sisteme omogene solubile. Membranele ar putea fi necesare, totuși, ca un mediu adecvat unei conformații ~ metastabile	Nu poate fi explicat satisfăcător
Cuplarea chemiosmotică	$\Delta pH + \Delta\psi$ Forța protonmotrice generată de reacțiile redox ale transportului de electroni	*Necesită funcții proprii membranelor.* Producerea forței protonmotrice este condiționată nu numai de prezența unor membrane intacte, ci obligatoriu de vezicule membranare topologic închise	Poate fi explicat prin proprietățile de conductori ale agenților decuplanți

PRINCIPIILE GENERALE ALE TEORIEI CHEMIOSMOTICE

La baza teoriei lui Mitchell stau următoarele observaţii şi deducţii:

— Cuplarea reacţiilor redox cu sinteza de ATP este condiţionată de desfăşurarea lor în membrane biologice intacte, care formează vezicule complet închise, deoarece membranele sînt parte integrantă a mecanismelor de cuplare. Sinteza ATP nu are loc pe fragmente lineare de membrane decît dacă acestea se organizează pentru a forma structuri sacciforme.

— Membranele care adăpostesc lanţul respirator sînt impermeabile faţă de ioni şi, în mod particular, faţă de ionii de H^+ şi $(OH)^-$, cu excepţia cazului cînd aceştia sînt acceptaţi de „transportori" sau de translocaze.

— Lanţul respirator este localizat în membrane în aşa fel încît reacţiile care eliberează H^+ au loc pe suprafaţa externă a membranei, iar cele care acceptă H^+ pe suprafaţa internă. Procesul de translocaţie a protonilor care stă la baza teoriei chemiosmotice este facilitat de faptul că purtătorii de H^+ alternează cu molecule care poartă numai electroni, iar moleculele-purtător ale lanţului respirator sînt aranjate în membrane, în zigzag, sub forma unor bucle, avînd un purtător de electroni îndreptat spre partea externă a membranei şi un purtător de H^+ cu faţa spre partea ei internă.

— Ca o consecinţă, deplasările protonilor şi ale electronilor în lanţul redox nu sînt întîmplătoare, ci au o direcţie geometrică, fiind orientate în planul membranei, întrucît forţa capabilă să producă o anumită reacţie este dependentă de orientarea spaţială a constituenţilor sistemului. În acest fel, geometria sistemului asigură deplasarea vectorială a H^+.

— Prezenţa în membrane a unei ATPaze capabilă să permită translocaţia reversibilă a protonilor.

FORMAREA GRADIENTULUI ELECTROCHIMIC

Datorită acestor particularităţi, lanţul respirator funcţionează ca un dispozitiv de conversie a energiei eliberate prin transportul de electroni în energia unui gradient electrochimic de protoni (fig. 51) prin următorul mecanism: cînd o moleculă care posedă un atom de H interacţionează cu o moleculă care acceptă numai electroni, protonul (H^+) este eliberat în soluţie. Cînd purtătorul de electroni cedează electronul său unui purtător de H^+, atomul de H este reconstituit prin extragerea H^+ din mediu. Acest proces antrenează o translocaţie a protonilor (H^+) prin membrană, prin care H^+ sînt pompaţi în afara acesteia. Deoarece membrana este o veziculă închisă, impermeabilă la protoni, se realizează o acumulare de H^+ pe suprafaţa ei externă şi o diferenţă de activitate electrochimică între exteriorul (electropozitiv şi acid) şi interiorul ei (electronegativ şi alcalin, datorită concentraţiei mari a ionilor $(OH)^-$). În cursul respiraţiei, trei perechi de electroni traversează membrana, transportînd de fiecare dată, cîte doi protoni din interior spre exteriorul membranei. În felul acesta, transferul a doi electroni de la NAD^+ la O_2 este însoţit de strămutarea la exterior a şase protoni (fig. 51). Rezultatul final al fiecărui transport de electroni este deci producerea unui

gradient electrochimic alcătuit din gradientul de potențial electric (diferența de sarcină), $\Delta\psi$, și gradientul de pH, Δ pH (reprezentînd concentrația H^+), în raport cu cele două părți ale membranei. La bacterii, gradientul de potențial electric este format în urma îndepărtării din citoplasmă a protonilor încărcați pozitiv și a acumulării lor în mediul extern, iar gradientul de pH

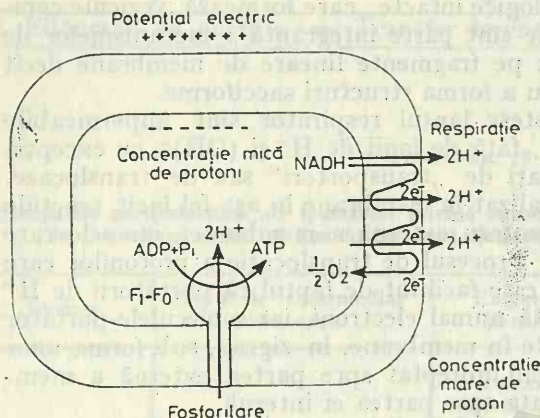


Fig. 51. — Schema fosforilării oxidative mitocondriale la microorganismele eucariote în lumina teoriei chemiosmotice. Perechile de electroni traversează membrana de 3 ori, transportînd de fiecare dată $2H^+$, din interiorul mitocondriilor la exterior. Rezultă un gradient de concentrație protonică și de potențial electric, care forțează protonii să traverseze din nou membrana, spre interior. Pentru fiecare $2H^+$ care traversează complexul F1—F0 se formează o moleculă de ATP (după Hinkle și Mc Carty, 1978).

(gradient chimic protonic) rezultă din alcalinizarea citoplasmei, consecutivă îndepărtării protonilor și acidifierea mediului extern datorită acumulării lor.

Forța protonmotrice. Suma celor două componente interconvertibile, *forța protonmotrice* („protonmotive force"), $\Delta\tilde{\mu}H^+$, care se exprimă în milivolți, determină o stare macroergică. Ea tinde să forțeze protonii să traverseze înapoi (spre interior) membrana prin complexul enzimatic F1 — F0 al ATPazei. Acesta, funcționînd ca o pompă de protoni inversată, asigură formarea unei molecule de ATP pentru fiecare pereche de protoni care o traversează. În acest proces, un rol esențial revine membranelor biologice, care delimitează nu numai anumite compartimente structurale, ci și unități elementare de funcție, bazate pe caracterul orientat în spațiu al reacțiilor chimice efectuate la nivelul lor. Energia gradientului protonic poate fi exprimată, după Mitchell, prin formula:

$$\Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\psi - Z\Delta\,\text{pH (mV)}$$

în care: $\Delta\tilde{\mu}H^+$ = forța protonmotrice (energia totală din gradientul protonic, exprimată în milivolți),
$\Delta\psi$ = gradientul de potențial electric (diferența de sarcină),
Δ pH = diferența de pH dintre interior și exterior,
Z = 2,3 RT/F. R este constanta gazelor, T = temperatura absolută. F = constanta Faraday. Z care are o valoare numerică de ~ 60 mV per unitate de pH, la 25°C, convertește gradientul de pH în milivolți.

Gradientul electrochimic poate fi măsurat în termeni de energie, indiferent de contribuția diferenței de pH sau a potențialului de membrană la realizarea lui. El reprezintă energia dobîndită de un proton cînd este trans-

portat prin membrană împotriva gradientului sau energia dobîndită de un proton cînd este transportat înapoi prin membrană în sensul gradientului. În cloroplaste, gradientul electrochimic este echivalent cu ~4,8 kcal per mol de protoni, în veziculele formate de membranele de *E. coli* este de ~ 4,4 kcal/mol, cel mai ridicat nivel fiind atins în mitocondrii (~ 5,3 kcal/mol de protoni). După Mitchell, sistemele transductoare de energie din membrane convertesc energia chimică sau fotonică în energie electrochimică, pentru ca ulterior să poată fi folosită în dirijarea proceselor care consumă energie printr-un flux invers de protoni și/sau de sarcini pozitive. În acest fel, energia gradientului electrochimic poate fi convertită în energie chimică, prin sinteza de ATP, sau în energie electrochimică sub forma unor gradiente de substraturi sau de ioni și folosită pentru a dirija lucru mecanic (de exemplu, mișcarea flagelilor). După Konings și Veldkamp (1983), intermediarii energetici centrali formați prin fiecare din procesele metabolice care generează energie sînt diferiți. În cazul fosforilării la nivelul substratului, intermediarul este ATP, în timp ce în procesele care generează energie chemiosmotică, intermediarul este gradientul electrochimic de protoni ($\Delta\tilde{\mu}H^+$). Fiecare intermediar poate dirija anumite procese care necesită energie. În felul acesta, procesele dirijate de ATP sînt diferite de cele dirijate de forța protonmotrice.

ATP este intermediarul energetic universal al proceselor de biosinteză, care furnizează energia necesară pentru transportul anumitor substanțe dizolvate, putînd fi folosit și pentru a genera forță protonmotrice. Forța protonmotrice furnizează energie pentru mișcarea flagelilor, transportul secundar al substanțelor, fluxul invers de electroni, reacțiile de transhidrogenare, ca și pentru unele procese ca fixarea azotului și transportul ADN (Konings și colab., 1981; Konings și Veldkamp, 1983). În celula bacteriană, cele două tipuri de procese producătoare de energie funcționează strîns interconectat (fig. 52). Forța protonmotrice dirijează acumularea de substraturi catabolice care, ulterior, sînt metabolizate, ducînd la producerea de ATP prin fosforilare la nivelul substratului și la generarea de putere reducătoare sub formă de NADH sau succinat. Acești intermediari reduși pot fi oxidați prin sistemele de

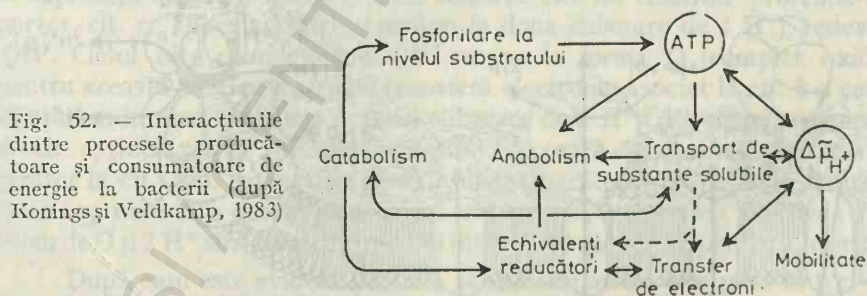


Fig. 52. — Interacțiunile dintre procesele producătoare și consumatoare de energie la bacterii (după Konings și Veldkamp, 1983)

transfer ale electronilor, în timp ce ATP poate fi hidrolizat de complexul ATPazei legat de membrane, fiecare ducînd prin pompare de protoni la producerea unei forțe protonmotrice (Konings și Veldkamp, 1983). Sistemele se comportă pe principiul vaselor comunicante. Cînd cantitatea de echivalenți reducători disponibilă este mare, transferul de electroni determină producerea unei forțe protonmotrice mari și ulterior sinteza de ATP. Cînd însă continu-

tul în ATP al celulei este ridicat și forța protonmotrice mică, hidroliza de ATP generează forță protonmotrice, iar cantitatea de ATP rămasă disponibilă pentru biosinteze diminuă.

În cele ce urmează prezentăm — după Hinkle și Mc Carty, 1978 — dinamica unor activități funcționale esențiale legate de sinteza și utilizarea ATP la microorganismele eucariote și procariote interpretate în lumina teoriei chemiosmotice.

FOSFORILAREA OXIDATIVĂ MITOCONDRIALĂ LA MICROORGANISMELE EUCARIOTE

Mitocondriile sînt prezente la toate microorganismele eucariote: fungi filamentoși, levuri, microalge și protozoare. Cercetările efectuate pe *Saccharomyces cerevisiae* și *Candida parapsilopsis* au evidențiat o structură tipică

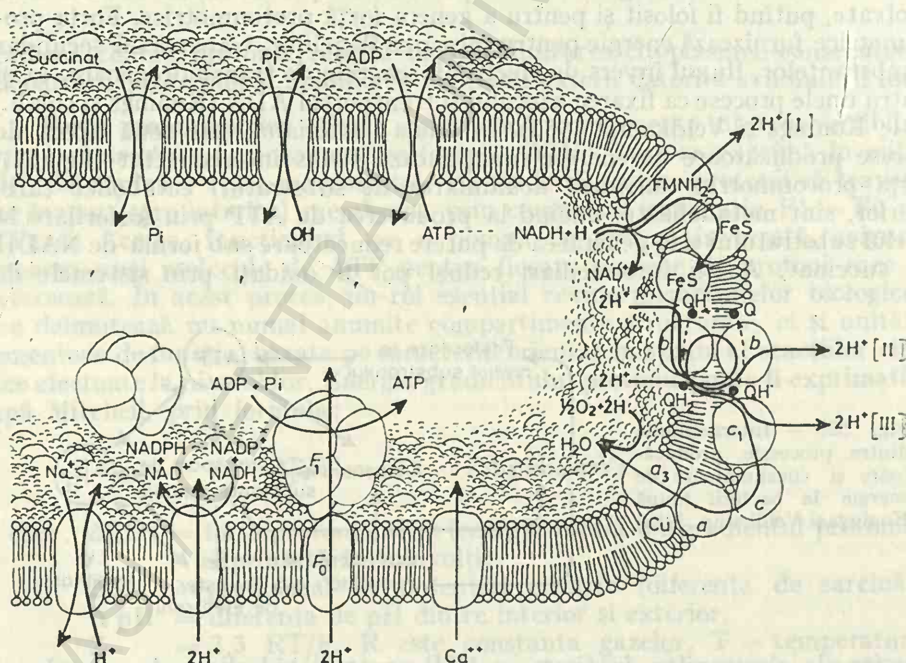


Fig. 53. — Reprezentarea schematică a fosforilării oxidative în membrana mitocondrială a microorganismelor eucariote, evidențiind așezarea componenților catenei de respirație celulară, transportul electronilor și al protonilor și rolul acestora în sinteza ATP la nivelul complexului F0—F1 al ATP-azei membranare. Schema include și alte procese dirijate de gradientul protonic, ca, de exemplu, reducerea $NADP^+$ de către NADH, transportul ionilor de calciu (Ca^{2+}) și sodiu (Na^+) (după Hinkle și Mc Carty, 1978).

și activități similare celor descrise la mitocondriile animale (Briggs și Linnane, 1963; Lascelles, 1965). Fig. 53 prezintă un segment din membrana mitocondrială, cu localizarea diferiților constituenți ai catenei de respirație celulară și funcționarea lor pentru a genera gradientul protonic.

În mitocondrii, atomii de H proveniți din ciclul acizilor tricarboxilici sînt preluați de NAD^+, principalul intermediar între acest ciclu și enzimele lanțului respirator. Fiecare moleculă de NAD^+ acceptă 2 electroni și un proton, formînd NADH (forma redusă). Respirația începe cu transferul a 2 electroni și un proton de la NADH (care revine la forma oxidată NAD^+) la flavoproteina FMN. În faza următoare, molecula de FMN (legată de o proteină mare inclavată, care traversează integral membrana) fixează un al doilea H^+ din mediul intern, formînd $FMNH_2$, care conține 2 atomi de H (2 electroni și 2 protoni). Printr-un mecanism încă neelucidat, $FMNH_2$ transferă 2 atomi de H din interior la suprafața externă a membranei, unde sînt ionizați, iar protonii lor sînt eliberați în mediul extramitocondrial. În acest fel, primii 2 H^+ sînt transportați prin membrana mitocondrială la exterior. După expulzarea lor, $FMNH_2$ revine la forma oxidată, inițială (FMN), care poate fi redusă din nou de NADH, iar cei 2 electroni se reîntorc pe fața internă a membranei, prin intermediul proteinelor FeS. Acestea transportă electronii numai unul cîte unul (nu perechi ca alți transportori), cedează 2 electroni la două molecule de ubichinonă (Co Q), care inițiază „ciclul Q". Cele două molecule de Co Q fixează, fiecare, cîte un proton din mediul intern pentru a forma 2 $QH^•$ (forma semioxidată sau semichinona). Utilizînd 2 electroni adiționali, furnizați de cit. *b*, și 2 H^+, proveniți din mediul intern mitocondrial, se formează două molecule de QH_2 (forma complet redusă).

Spre deosebire de celelalte molecule-purtător de electroni, care sînt imobile, avînd, în special, rolul de „conducte" pentru electroni și atomii de H, Co Q este solubilă în matricea lipidică a membranei, astfel încît fiecare din cele două molecule de QH_2 traversează membrana, de la fața sa internă la suprafața externă, unde, fiecare, cedează cîte un electron proteinei-transportor, cit. c_1, eliberînd cîte un proton (a doua eliberare de 2 H^+), redevenind $QH^•$. Ciclul este complet cînd $QH^•$ revine la forma Q (complet oxidată); pentru aceasta, fiecare moleculă transferă electronul asociat la cit. *b* și cedează H^+ rămas în mediul extern (a treia eliberare de 2 H^+). Electronii transportați de cit. c_1 (inclavat pe suprafața externă) își continuă „drumul" în lanțul respirator la cit. *a* și, traversînd pentru ultima oară membrana, sînt transferați la cit. a_3, care este oxidat de O_2. În acest proces, 2 electroni sînt cedați unui atom de O și 2 H^+ sînt fixați din mediul intern, mitocondrial, pentru a forma H_2O.

După cum este evident (fig. 47), lanțul respirator este pliat în trei bucle de oxidoreducere, fiecare dintre ele corespunzînd unuia din cele trei situsuri de cuplare a energiei eliberate, cu sinteză de ATP. În felul acesta, fiecare pereche de electroni face 3 „călătorii" dus-întors prin membrană, creînd între NADH și acceptorul final o diferență de potențial de ~ 1,2 v. Circuitul protonilor este completat prin introducerea lor în complexul ATP-azei, prin care fiecare 2 H^+ introduși asigură sinteza unei molecule de ATP.

FOSFORILAREA OXIDATIVĂ LA BACTERII

Sistemul de proteine respiratorii evidenţiat în membrana plasmatică a *E. coli*, ca şi la alte bacterii, include constituenţi analogi celor descrişi în mitocondrii şi, ca urmare, funcţionează după aceleaşi principii. Singura deosebire majoră faţă de respiraţia din mitocondrii este determinată de faptul

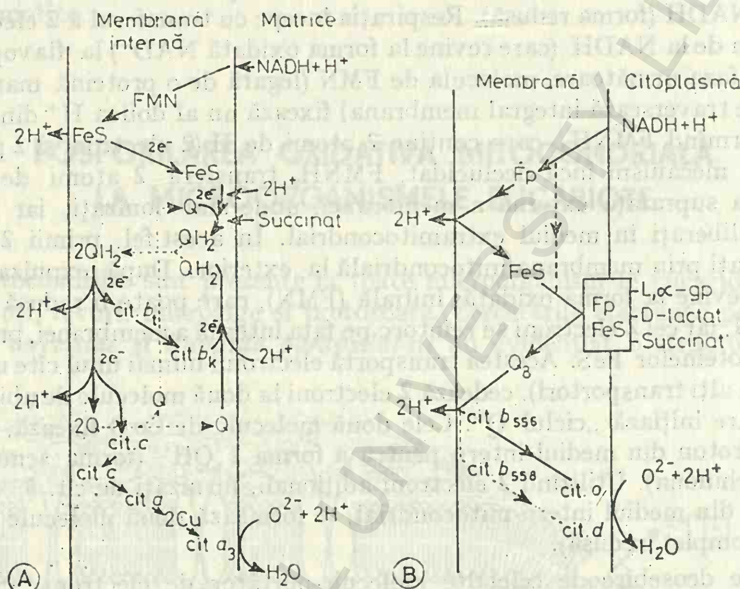


Fig. 54. — Organizarea funcţională comparată a lanţurilor transportoare de electroni în mitocondrii (A) şi în membrana plasmatică a bacteriei *E. coli*, cultivată în aerobioză(B), cu menţionarea translocaţiei de protoni. Liniile punctate marchează căile alternative de export. FMN — flavinmononucleotid; FeS — proteină fier sulf; Q — ubichinonă; QH_2 — ubichinol; FP — flavoproteină; L, α-gp — L, α -glicerofosfat, Cu — proteine redox care conţin Cu (după Ohnishi, 1973 şi Haddock şi Jones, 1977).

că lanţul respirator al *E. coli* este mai simplu decît cel mitocondrial şi lipsit de „ciclul Q" (fig. 54). Ca urmare, pentru fiecare pereche de electroni care îl străbate, sînt exportaţi din celulă numai 4 H^+ în loc de 6 H^+. La *E. coli*, atomii de H proveniţi din ciclul Krebs, preluaţi de NADH, sînt cedaţi la FAD (flavoproteină analogă FMN), cu formare de $FADH_2$. Ca şi FMN, FAD, care este asociată cu o proteină membranară, exportă 2 H pe suprafaţa externă a membranei, unde aceştia se ionizează. Protonii rămîn la exterior (primii $2H^+$ exportaţi), iar electronii se reîntorc în celulă, pe faţa internă a membranei, prin intermediul proteinelor FeS. În faza următoare, cei 2 electroni sînt cedaţi unei singure molecule de Q (menachinonă), care preia din mediul extern 2 H^+ pentru a forma QH_2, ce difuzează prin membrana plasmatică şi eliberează alţi 2 H^+, la exteriorul acesteia. Cei 2 electroni rămaşi trec înapoi prin membrană în mediul intern, prin intermediul cit. *b* şi cit. *o*, ultimul fiind oxidat de acceptorul final de electroni, oxigenul.

În consecință, în cazul bacteriilor, fiecare pereche de electroni traversează numai de două ori membrana (fig. 55), determinînd translocația a 4 protoni și sinteza a două molecule de ATP (Hinkle și Mc Carty, 1978).

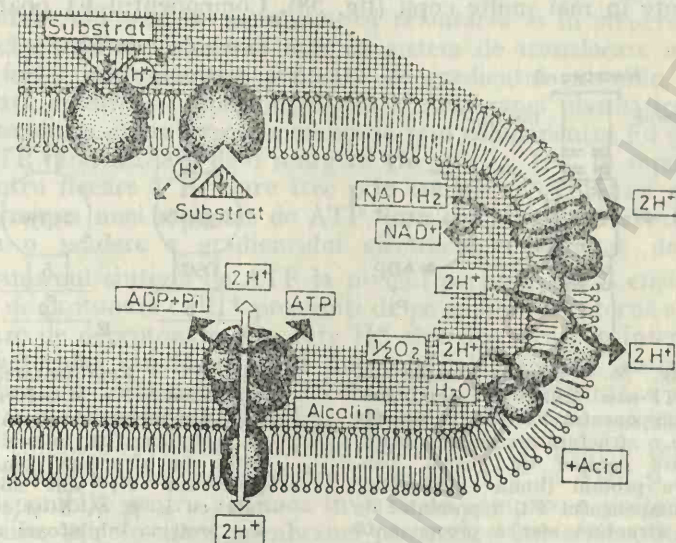


Fig. 55. — Reprezentarea schematică a unora dintre sistemele transductoare de energie chemiosmotică, din membrana plasmatică bacteriană (după Konings și Veldkamp, 1983).

ATP-AZA ȘI ROLUL SĂU

Enzimele care cuplează difuzia protonilor cu sinteza ATP catalizează translocația lor obligatorie și reversibilă prin membrane. Ele formează complexul ATP-azei, vizibil pe microelectronografii, după colorare negativă, datorită capacității de a forma conjugate cu anticorpii, față de ATP-aza purificată, marcați cu feritină. În aceste condiții, se prezintă sub forma unor corpi globulari care bombează spre interior, pe suprafața membranei plasmatice la *E. coli*, ca și pe suprafața cristelor mitocondriale sau spre exteriorul membranei în cazul cloroplastelor. Rolul lor a fost demonstrat prin incapacitatea bacteriilor care nu posedă aceste enzime funcționale (ca rezultat al unor mutații) de a fosforila ADP la ATP prin mecanismul transportului respirator al electronilor.

Complexul ATP-azei (adenozintrifosfataza, ATP-sintetaza sau factorul de cuplare F1—F0), (fig. 56), este alcătuit din: — porțiunea (placa) bazală F0, o proteină inclavată în membrană, hidrofobă, lipsită de activitate catalitică, cu rolul unui „canal" prin care protonii traversează membrana; — porțiunea activă F1 sau factorul de cuplare propriu-zis, avînd forma unui „buton" care bombează la suprafața membranei. Cele două porțiuni sînt legate printr-un segment proteic — componentul F3 — cunoscut sub denumirea de peduncul sau „gît".

Componentul F1 (F1 — ATP-aza) a fost izolat de Racker și Pulman (1960) sub forma unui complex proteic, ușor de îndepărtat din membrană (fig. 57). El este alcătuit din cinci subunități diferite (notate α, β, γ, δ, ε), unele prezente în mai multe copii (fig. 58). Componentul F1 poartă situsul

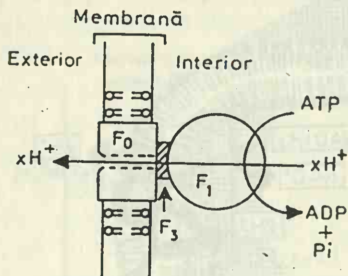


Fig. 56. — Schema complexului ATP-azei legat de membrane. Componentul F1 este reprezentat de o structură transmembranară, care conține un „canal" pentru protoni (liniile întrerupte). Componentul F1, reprezentat de o structură sferică proeminentă spre interior, este legat de F0 printr-un „peduncul" (regiunea hașurată), reprezentat de un polipeptid specific, componentul F3 (după Garland, 1981).

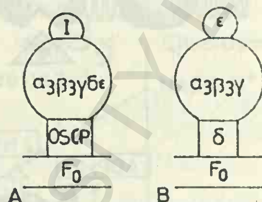


Fig. 57. — Reprezentarea diagramatică a structurii ATP-azei mitocondriale (A) și bacteriene (B). Subunitățile din structura componentului F1 sînt notate cu α, β, γ, δ și ε; I— proteina inhibitoare a ATP-azei; OSCP—constituentul major secundar al componentului F0 mitocondrial, absent în ATP-aza bacteriană (după Haddock și Jones, 1977).

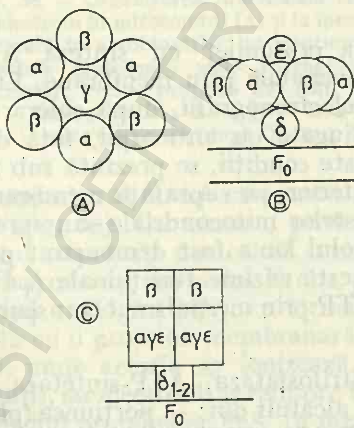


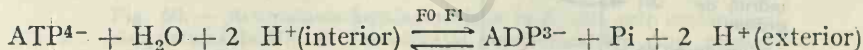
Fig. 58. — Aranjamentul subunităților în componentul F1 al ATP-azei din *E. coli*, presupunînd structura α_3, β_3, γ, δ, ε. A. Secțiune transversală prin hexagonul α_3, β_3. B. Vedere laterală a grupării subunităților (după Bragg și Hou, 1975). C. Schema grupării subunităților presupunînd structura α_2, β_2, γ_2, δ_{1-2}, ε_2 (după Vogel și Steinhart, 1976).

de activitate enzimatică și păstrează activitățile complexului (ATP $\rightleftarrows$ ADP + + Pi) chiar după ce este izolat din membrană. Reacția de sinteză a ATP nu poate fi observată în soluție, deoarece stabilirea gradientului protonic este condiționată de prezența unor structuri membranare veziculare închise.

Componentul F0, mai puţin bine caracterizat, este alcătuit din patru sau mai multe polipeptide diferite. Este lipsit de activitate ATP-azică şi nu poate fi izolat din membrană decît după tratare cu detergenţi.

Legarea ATP-azei de membrane şi orientarea ei în structura acestora favorizează exercitarea funcţiei sale ca sistem de translocare a protonilor. Datorită forţei protonmotrice generată de gradientul protonic, protonii de pe suprafaţa externă a mitocondriei sau a membranei plasmatice bacteriene vor avea tendinţa să traverseze membrana prin componentul F0 spre interior, sinteza ATP fiind dirijată de o scurgere „la vale" a H^+, în raport cu gradientul. Pentru fiecare 2 H^+ care trec prin complexul ATP-azei spre interior are loc formarea unei molecule de ATP, prin combinarea ADP cu Pi, concomitent cu o scădere a gradientului electrochimic generat de respiraţie.

Mecanismul sintezei de ATP la nivelul porţiunii F1 a enzimei implică două faze de protonare cu H^+ proveniţi de pe suprafaţa externă a membranei şi două faze de deprotonare prin care H^+ sînt descărcaţi în interior, în citoplasma bacteriilor sau în matricea mitocondrială alcalină, datorită concentraţiei ridicate a ionilor $(OH)^-$. O caracteristică importantă a complexului ATP-azei este aceea că în condiţii electrochimice corespunzătoare poate funcţiona complet reversibil, utilizînd hidroliza ATP pentru producerea de forţă protonmotrice, respectiv pentru a desface ATP la ADP şi Pi, utilizînd energia disponibilă pentru acţiunea inversă de pompare a protonilor în afara mitocondriilor sau în afara membranei plasmatice bacteriene. Reacţia generală catalizată de ATP-aza translocatoare de protoni este următoarea:



$$ATP^{4-} + H_2O + 2\ H^+(\text{interior}) \xrightleftharpoons{F0\ F1} ADP^{3-} + Pi + 2\ H^+(\text{exterior})$$

Într-o ipoteză recentă, Harris (1982) consideră că ATP-aza joacă un rol esenţial în faza ultimă a sintezei de ATP (captarea energiei prin formarea de legături chimice), datorită capacităţii sale de a lega ATP atît de puternic, în raport cu legarea ADP şi Pi, încît conversia ADP + Pi la ATP, pe enzimă, nu ar necesita aport de energie. Energia necesară pentru sinteza continuă de ATP ar fi utilizată pentru menţinerea strîns legată a ATP de situsul de legare enzimatic, prin intermediul unor modificări conformaţionale. Legarea protonilor de ATP-ază ar fi, probabil, răspunzătoare de această modificare conformaţională.

SEMNIFICAŢIA BIOLOGICĂ GENERALĂ A POTENŢIALULUI ELECTROCHIMIC

Datele experimentale acumulate pînă în prezent demonstrează caracterul universal de aplicare al conceptelor teoriei chemiosmotice la fenomenele de conservare a energiei în sistemele biologice. Valabilitatea lor pentru mitocondrii, cloroplaste şi bacterii reprezintă un argument suplimentar — pe lîngă cele de ordin structural şi biochimic — pentru originea bacteriană simbiotică a celor două organite.

ROLUL FORȚEI PROTONMOTRICE ÎN FENOMENELE DE TRANSPORT

Teoria lui Mitchell are implicații în explicarea mecanismelor de transport activ prin membrane, iar la bacterii în furnizarea de energie pentru mobilitate.

Translocația protonilor generată de lanțul respirator poate fi cuplată cu transportul activ, prin intermediul unor purtători bifuncționali, dotați cu un situs de legare pentru substrat și un altul pentru protoni.

Transportul ionilor de Na^+ se realizează după un mecanism similar la bacterii și mitocondrii și este dirijat numai de un component al gradientului protonic, și anume de diferența în concentrația de H^+ (adică de pH). Schimbul este mediat de o proteină de membrană și se realizează printr-un mecanism de contratransport sau de $Na^+ - H^+$ antiport (Mitchell, 1970)

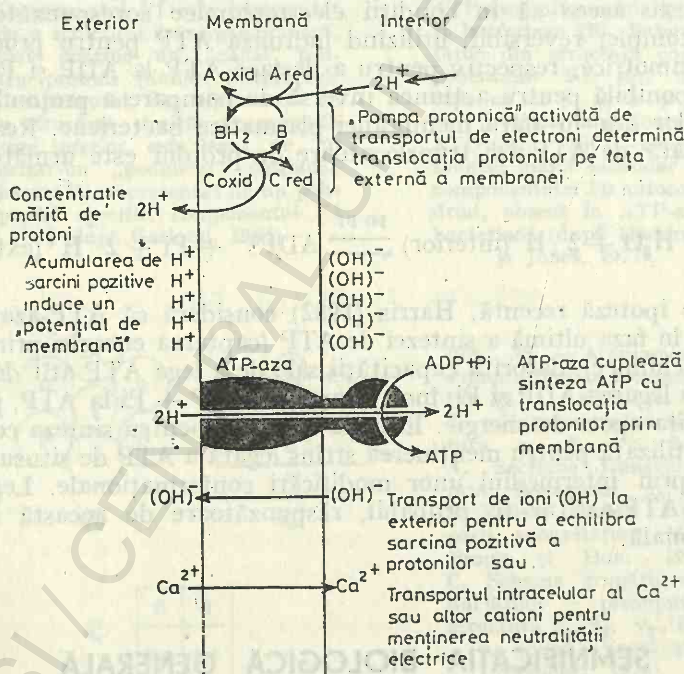


Fig. 59. — Reprezentarea schematică a fenomenelor ce se produc la nivelul membranelor, în cursul fosforilării oxidative, conform teoriei chemiosmotice.

prin care translocația unui ion este cuplată cu translocația celuilalt în direcție opusă: trecerea unui H^+ în spațiul perimitocondrial sau în afara celulei bacteriene este asociată cu transferul Na^+ în spațiul intern (matricea mitocondrială sau citoplasma bacteriană).

Transportul Ca^{2+} dirijat de diferența de potențial electric (indiferent de pH) se realizează în direcții opuse la bacterii față de mitocondrii. *E. coli* eliberează un ion de Ca^{2+} pentru fiecare 2 H^+, în timp ce mitocondriile îl înglobează, sub controlul potențialului de membrană (fig. 59).

Acumularea β-galactozidelor la E. coli se realizează printr-un mecanism de *cotransport* sau *simport de* H^+*:* translocația lor este cuplată cu translocația în aceeași direcție a H^+ și se realizează prin intermediul unui purtător membranar *(simportor sau cotransportor)*, care transportă β-galactozide și H^+ prin membrană, în celulă, în relația 1 : 1 (fig. 60 A). Sistemul este simetric deoarece,

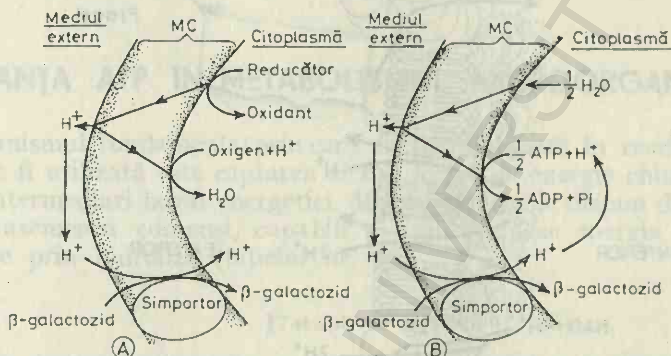


Fig. 60. — Acumularea β-galactozidelor în *E. coli*, prin mecanismul simportului de H+. A. Translocația β-galactozidelor cînd gradientul protonic este generat de respirație. B. Translocația β-galactozidelor determinată de hidroliza de ATP (după Mitchell, 1970).

în funcție de polaritatea gradientului protonic, zaharul poate fi concentrat de fiecare parte a membranei celulare. Sisteme similare au fost identificate la *E. coli* pentru transportul aminoacizilor.

Transportul β-galactozidelor poate fi dirijat și de hidroliza ATP, datorită capacității sale de a genera un gradient de H^+ (fig. 60 B).

ROLUL FORȚEI PROTONMOTRICE ÎN MOBILITATEA BACTERIILOR

Gradientul electrochimic protonic este răspunzător și de rotația flagelului bacterian (Berg, 1977). Discul rotor al acestuia are forma unui inel alcătuit din 16 proteine și este fixat pe un disc similar, legat de peretele celular. Protonii trec prin inelul proteic care formează rotorul, generînd forța de rotație în raport cu inelul adiacent (fig. 61). Trecerea unui proton prin fiecare din cele 16 unități proteice ale rotorului determină rotația flagelului cu 1/16 de tură. O rotație completă a flagelului necesită deci un consum de 256 protoni (16 × 16) (Hinkle și Mc Carty, 1978).

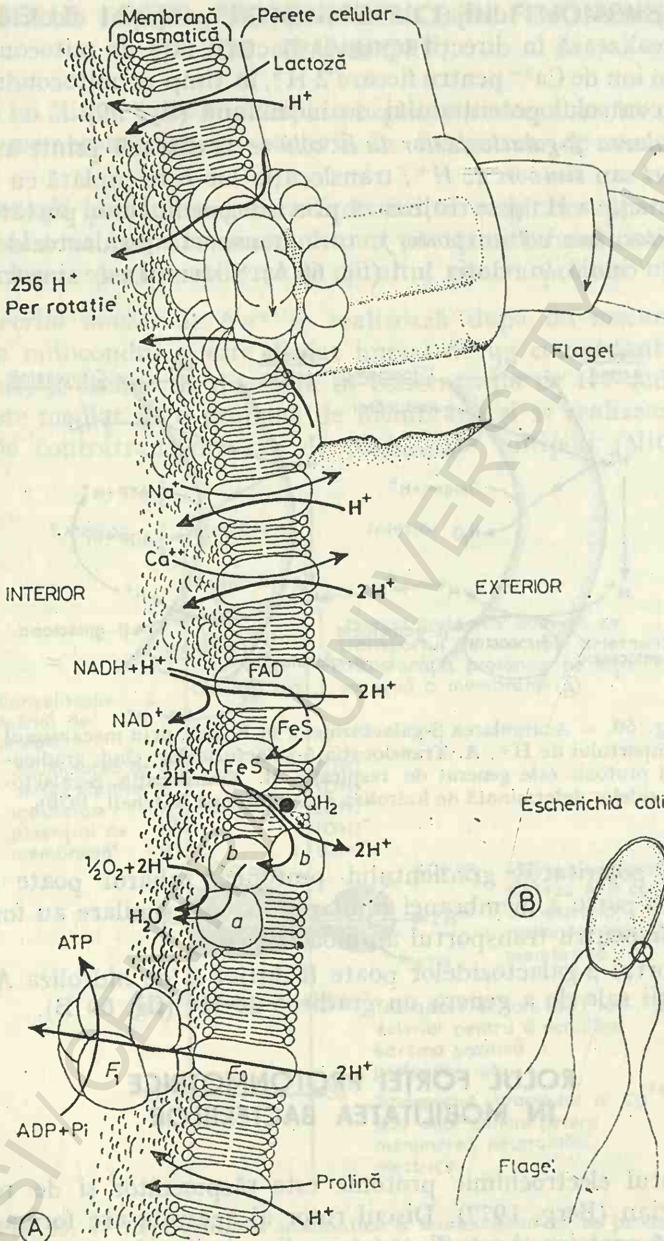


Fig. 61. — Rolul forței protonmotrice în rotația flagelilor la *E. coli*. A. Schemă de detaliu a regiunii încadrată într-un cerc, la rădăcina unui flagel (B) (după Hinkle și Mc Carty, 1978).

SEMNIFICAȚIA TEORETICĂ A IPOTEZEI CHEMIOSMOTICE

Pe plan teoretic, cercetările lui Mitchell, avînd ca punct de plecare inițial funcția de simport a permeazei *lac* de la *E. coli* și cristalizarea conceptuală a teoriei chemiosmotice, au făcut ca energetica microorganismelor să reflecte, în prezent, practic, toate preocupările domeniului vast al bioenergeticii. Ele au adus o lumină nouă nu numai asupra proceselor de transport în sistemele biologice, dar tind să producă o mutație în conceptele de bază ale biochimiei moderne, deoarece „reacțiile chimice sînt procese de transport, cînd sînt privite în detaliu. De aceea, este mai ușor de explicat biochimia în termeni de transport, decît transportul în termeni de biochimie" (Mitchell, 1979).

IMPORTANȚA ATP ÎN METABOLISMUL MICROORGANISMELOR

Mecanismul fundamental prin care energia eliberată în reacțiile de oxidare poate fi utilizată este captarea ei sub formă de energie chimică, cu formare de intermediari bogat energetici. Microorganismele dispun de mai multe tipuri de asemenea compuși, capabili să înmagazineze energia liberă și să o elibereze prin hidroliză (tabelul nr. 20).

Tabelul nr. 20

Energia liberă standard de hidroliză a unor compuși fosforilați, cu importanță în metabolismul microorganismelor

Compusul	$\Delta G^{\circ\prime}$		Compusul	$\Delta G^{\circ\prime}$	
	kj/mol	kcal/mol		kj/mol	kcal/mol
Fosfoenolpiruvat	−61,9	−14,8	ATP→ADP + Pi	−30,5	−7,3
Carbamilfosfat	−51,4	−12,3	Glucozo-1-fosfat	−20,9	−6,0
1,3-difosfoglicerat	−49,9	−11,8	Fructozo-6-fosfat	−15,9	−3,8
Acetilfosfat	−42,3	−10,1	Glucozo-6-fosfat	−13,8	−3,3
Argininfosfat	−33,5	−8,0	3-fosfoglicerat	−9,2	−2,2

După cum rezultă din tabel, valorile energiei libere de hidroliză clasează compușii respectivi în două categorii: intermediari ai glicolizei, cu valori $\Delta G^{\circ\prime}$ mai mici decît ale ATP, și fosfați macroergici, cu valori superioare. Scala reprezintă o măsură cantitativă a afinității compușilor pentru gruparea fosforil. Cei din zona superioară a scalei tind să piardă gruparea Ⓟ, în timp ce compușii din zona inferioară tind să-l mențină. Scala termodinamică indică și direcția transferului enzimatic al grupării Ⓟ care are loc numai de la compușii cu potențial ridicat la cei cu potențial scăzut. În afara acestor compuși, microorganismele pot utiliza și alți compuși macroergici, ca acetil-CoA (probabil dintre cei mai importanți), succinil-CoA etc.

ATP, prin poziția sa în regiunea de mijloc a scalei termodinamice, reprezintă cea mai importantă categorie de molecule de transfer, care face legătura între procesele catabolismului ce generează energie și cele care consumă energie în celulă (biosinteze, mișcare, transport activ etc.) (fig. 62).

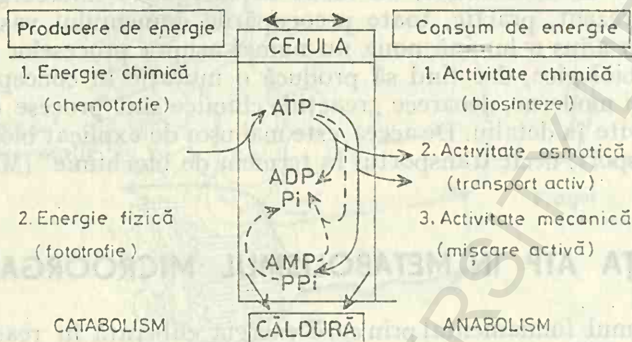


Fig. 62. — Transformările energiei pe calea sistemului ATP. Pi—fosfat anorganic; PPi — pirofosfat anorganic; arată conexiunea AMP și PPi cu ADP și Pi, utilizînd catabolismul pe calea adenilat kinazei și pirofosfatazei anorganice (după Thauer și colab., 1977).

Cuplarea energiei este asociată cu sinteza de ATP, iar eliberarea ei cu hidroliza legăturilor macroergice (~) ale ATP. Cele două legături ~ P terminale ale ATP sînt numite „macroergice", lăsînd să se înțeleagă, în mod eronat, că marea cantitate de energie este localizată la nivelul lor. Noțiunea de legătură macroergică trebuie interpretată ca o modalitate de formulare convențională, utilă în limbajul curent. Energia nu este localizată în legăturile ~ P terminale, ci sinteza sau hidroliza lor sînt însoțite de mari modificări în structura și energia de rezonanță a moleculei de ATP ca întreg.

Rolul unic al ATP în viața microorganismelor decurge din structura sa chimică și din amploarea schimburilor energetice, care însoțesc sinteza și hidroliza legăturilor ~ (fig. 63). Cantitatea de energie eliberată este foarte apropiată de cea necesară pentru ca reacțiile biochimice să aibă loc, fără risipă mare (cum s-ar întîmpla, spre exemplu, în cazul utilizării fosfoenolpiruvatului).

Structura ATP, precum și modul său de formare și de utilizare corespund particularităților sistemelor biologice, în general, care nu pot utiliza și nici tolera modificările drastice de energie. Ele răspund totodată principiului optimalității, deoarece reprezintă o modalitate foarte eficientă prin care celula își coordonează producerea de energie, cu stocarea și utilizarea ei.

ATP conferă celulelor un grad important de flexibilitate, datorită faptului că reacțiile producătoare de energie nu sînt cuplate direct cu cele în care energia este utilizată. Ca urmare, cele două procese, de producere și de utilizare a energiei, pot fi independente și separate, fizic (spațial) și temporal. ATP este nespecific din punctul de vedere funcțional: energia stocată poate fi utilizată universal (pentru biosinteze, transport, mișcare etc.), în orice

moment, indiferent de natura sursei din care provine sau de natura sistemului care necesită energie.

Putînd difuza în diferite regiuni ale celulei unde este necesară, energia înmagazinată în ATP reprezintă și o formă de transport a energiei eliberate în metabolism. De aceea, ATP este considerat ca reprezentînd ,,moneda energetică universală'' a sistemelor biologice.

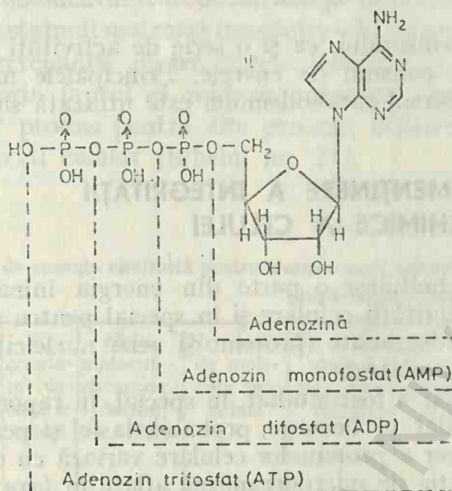


Fig. 63. — Structura AMP, ADP și ATP.

În sfîrșit, o parte din energia stocată în ATP poate fi transferată anumitor molecule specifice acceptor, care devin ,,energizate'' și pot funcționa ca precursori ai unor biomolecule mai mari. În populațiile bacteriene în curs de creștere există o cuplare între reacțiile de catabolism și cele de anabolism. În acest context, viteza de utilizare a energiei din ATP determină viteza sa de regenerare de la ADP, utilizînd energia din mediu. Cu toate acestea, celulele conțin o cantitate mică de ATP liber (,,pool de ATP''), apreciată la o celulă bacteriană ca reprezentînd ~ 1/1 000 din cantitatea de ATP necesară pentru a produce bacteria respectivă. După Rose (1976), suma concentrațiilor AMP + + ADP + ATP într-un microorganism este de ~ 10—20 μmoli/g greutate uscată, concentrația ATP depășind suma concentrațiilor AMP + ADP. În felul acesta, celula bacteriană, spre exemplu, poate fi convențional considerată ca un acumulator a cărui stare este în funcție de gradul în care sistemul ATP— ADP — AMP este ,,umplut'' cu legături ~ P. Atkinson (citat de Rose, 1976) a exprimat aceasta printr-un indice cantitativ — ,,încărcătura energetică'' (IE) sau ,,încărcătura de adenilat'' — care poate fi calculat după formula:

$$\text{I.E} = \frac{0{,}5\,[\text{ADP}] + 2\,[\text{ATP}]}{[\text{AMP}] + [\text{ADP}] + [\text{ATP}]}$$

Valoarea acestui indice la microorganisme oscilează între 0 și 1,0. Sistemele care conțin numai ATP au o încărcătură energetică egală cu 1, iar cele care conțin numai AMP au încărcătura egală cu 0. Măsurătorile experi-

mentale au arătat că, în general, încărcătura energetică a microorganismelor care cresc este de ~ 0,8. Bacteria *E. coli* moare la valori sub 0,5 (Gottschalk, 1979).

ASPECTE ALE CONSUMULUI DE ENERGIE

Diferitele reacții ale anabolismului, ca și o serie de activități biologice ale microorganismelor necesită consum de energie. Principalele modalități prin care energia eliberată în cursul catabolismului este utilizată sînt următoarele:

ENERGIA DE MENȚINERE A INTEGRITĂȚII FIZICOCHIMICE A CELULEI

Toate microorganismele cheltuiesc o parte din energia înmagazinată în ATP pentru menținerea integrității celulare și în special pentru refacerea moleculelor care sînt continuu degradate (proteine și acizi nucleici) și care, deci, necesită o reînnoire prin resinteză.

Procesul de turnover celular a fost studiat, în special, în raport cu sinteza și degradarea proteinelor, dar el decurge, probabil, la fel și pentru alte macromolecule. Rata de turnover a proteinelor celulare variază cu condițiile de mediu. Astfel, într-o populație de microorganisme aflate în faza de creștere, rata de turnover proteic depășește rar 2—3 % h^{-1}, în timp ce în celulele supuse înfometării este cu mult mai mare.

„Coeficientul de menținere" este mai mare la bacteriile care cresc anaerob, deoarece metabolismul energetic este mai puțin eficient în condiții de anaerobioză; spre exemplu, *Aerobacter cloacae* necesită 0,09 g glucoză/g bacterii uscate în aerobioză și 0,47 g glucoză în anaerobioză. După Pirt (1974), pe baza acestor date, cantitatea de ATP necesară pentru *a menține* un gram de greutate bacteriană uscată reprezintă ~ 1/20 din cantitatea de ATP necesară pentru *producerea* aceleiași cantități.

ENERGIA NECESARĂ PENTRU BIOSINTEZE

Procesul de biosinteză implică consum de energie pentru sinteza constituenților celulari noi și a celor de rezervă (poli-β-hidroxibutirat, glicogen etc.), formarea blocurilor de construcție sau a monomerilor și polimerizarea lor pentru formarea diferitelor tipuri de macromolecule (acizi nucleici, proteine, polizaharide, peptidoglican etc.).

Energia cheltuită pentru biosinteze a fost calculată în funcție de cantitatea de ATP consumată pentru sinteza unei cantități determinate de material celular microbian în anumite condiții experimentale.

În practică se folosește indicele Bauchop-Elsden, reprezentat de numărul de grame de material celular uscat produs de la un mol de ATP. Acest indice, calculat pentru diferite microorganisme, ca bacterii *(S. faecalis)* și

levuri (*S. cerevisiae*), cultivate anaerob pe substraturi nutritive care permit producerea de ATP prin fosforilare la nivelul substratului, are valoarea medie de 10,5 (respectiv se produc 10,5 g masă celulară uscată pentru fiecare mol de ATP consumat). S-ar părea că pentru biosinteze, în condiţiile menţionate consumul ar avea aceeaşi valoare la toate microorganismele, deoarece valoarea indicelui Bauchop-Elsden este aproximativ aceeaşi la toate bacteriile, ca şi la celelalte microorganisme studiate pînă în prezent.

Randamentul teoretic *calculat* pe baza căilor biochimice care duc la sinteze celulare este mult mai mare (respectiv ~ 31 g masă bacteriană uscată/mol de ATP).

Discrepanţa dintre datele teoretice şi cele experimentale s-ar putea explica prin faptul că microorganismele cheltuiesc o cantitate importantă din ATP produs pentru alte procese, diferite de cele care duc la formarea de material celular (tabelul nr. 21).

Tabelul nr. 21

Cantitatea de energie cheltuită pentru sinteza unei celule bacteriene de la monomerii preformaţi (după Rose, 1976)

Componentul	% greutate uscată în celulă	Masa moleculară aprox. (daltoni × 10^{-6})	Nr. mediu de molecule per celulă	Nr. de monomeri per moleculă	Nr. total de monomeri per celulă	Nr. de molecule ATP necesar pt. adiţia unui monomer	Nr. de molecule ATP necesar pt. sinteza unei celule (× 10^{-6})	% total cheltuit
ADN	3	2,000	1	$6,5\times10^6$	$6,5\times10^6$	2	13	0,27
ARN	10	1,0	15 000	$3,1\times10^3$	47×10^6	2	94	1,94
Proteine	62	0,06	1 600 000	550	880×10^6	5	4 400	91,00
Lipide	10	0,001	15 000 000	1	15×10^6	7	105	2,17
Polizaharide	15	0,2	113 000	1 000	113×10^6	2	226	4,67

Din calcul rezultă că sînt necesare 4 838 × 10^6 molecule de ATP pentru a sintetiza o bacterie (2,5 × 10^{-13} g greutate uscată). Pentru a sintetiza 31 g celule (greutate uscată) sînt suficiente 6,02 × 10^{23} molecule de ATP (corespunzînd numărului de molecule prezente într-un mol).

ENERGIA NECESARĂ PENTRU PROCESELE DE TRANSPORT

Energia consumată pentru procesele de transport şi cele de translocaţie de grup a diferitelor substanţe dizolvate, ca şi ale ionilor minerali esenţiali pentru viaţa celulelor reprezintă, probabil, o cotă importantă din energia produsă, dar — în prezent — greu sau imposibil de cuantificat.

ENERGIA NECESARĂ PENTRU MOTILITATE

Motilitatea cililor și a flagelilor este rezultatul transformării energiei chimice în energie mecanică. Dovadă este faptul că motilitatea microorganismelor este condiționată de existența unor mecanisme producătoare de ATP. În cazul bacteriilor strict aerobe care produc ATP prin fosforilare oxidativă, prezența O_2 este absolut necesară, dacă mediul de cultură nu conține arginină. În prezența argininei se produce ATP prin fosforilare la nivelul substratului și durata motilității condiționată de producerea de ATP prin acest mecanism este direct proporțională, pentru o densitate bacteriană dată, cu cantitatea de arginină din mediu.

În acord cu teoria lui Mitchell, rotația flagelului bacterian este determinată de influxul de protoni. La „rădăcina" flagelului este un inel de 16 proteine fixat pe un inel similar al peretelui celular. Pentru ca flagelul să se rotească cu o șaisprezecime (1/16) de tură este necesar ca fiecare proteină să fie traversată de un proton, ceea ce reprezintă un consum de 256 protoni la fiecare rotație a flagelului (Hinkle și Mc Carty, 1978).

PIERDEREA DE ATP SUB FORMĂ DE CĂLDURĂ

Microorganismele produc căldură ca rezultat al activității metabolice (reacții exergonice) care, în anumite cazuri, ridică temperatura mediului punînd probleme dificile în special în industria fermentativă.

Producerea de căldură are loc, în special, în reacții care necesită ATP în cantități inferioare energiei eliberate prin desfacerea unei legături ~. Spre exemplu, pentru formarea unei legături amidă sau ester într-o moleculă oarecare sînt necesare ~ 3 kcal, dar în reacțiile care duc la formarea fiecăreia este desfăcută efectiv o legătură ~ completă din ATP (7,3 kcal). Diferența, respectiv cea mai mare parte din energie, este pierdută sub formă de căldură.

O altă cale de producere a căldurii ar fi determinată de acțiunea ATP-azei, care ar avea rolul de a disipa excesul de ATP, ajutînd la reglarea metabolismului celular.

După datele lui Pirt, producerea de căldură este mai mare la microorganisme decît la organismele superioare, ceea ce ar putea indica o mai mică eficiență a cuplării ATP cu reacțiile biosintetice. Ea ar corespunde la 1 kcal/oră/g celule uscate la *E. coli*, comparativ cu 0,1 kcal la *Drosophila* și 0,01 kcal la om (Pirt, 1974).

METABOLISMUL DE BIOSINTEZĂ AL MICROORGANISMELOR

Căile metabolismului de biosinteză la microorganisme au fost relativ puțin cunoscute, chiar după descoperirea celor producătoare de energie. Această situație s-a datorat unor condiții specifice, între care următoarele: 1) fiecare celulă individuală metabolizează relativ puțin material și, ca urmare, enzimele sînt prezente în cantități mici; 2) intermediarii pentru biosinteze sînt normal prezenți în celulă în cantități prea mici pentru a fi detectați și pînă în prezent nu au fost găsite substanțe inhibitoare selective, capabile să asigure acumularea lor în mediu; 3) reacțiile biosintetice sînt endergonice și studiul lor *in vitro* nu poate fi realizat decît dacă cuplarea lor cu utilizarea ATP este înțeleasă.

*

Biosinteza constituenților celulari este condiționată de prezența în mediu a unei surse adecvate de energie și a unor cantități convenabile de compuși cu greutate moleculară mică, utilizați ca precursori sau ca materiale

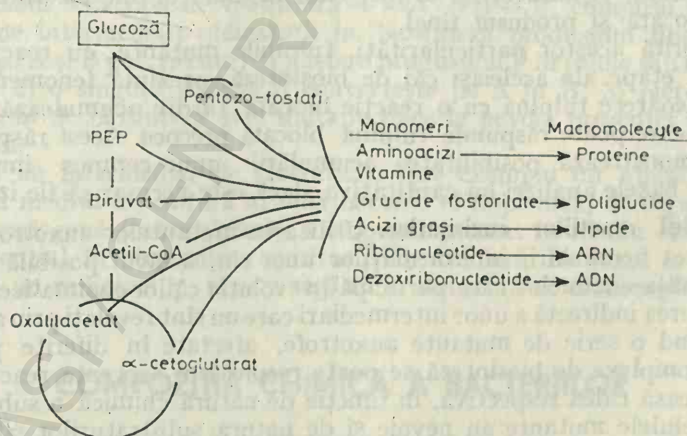


Fig. 64. — Schema generală a biosintezei constituenților celulari ai microorganismelor, de la glucoză (după Gottschalk, 1979).

de construcție în biosinteze. Uneori, acești compuși (de ex., zaharuri, aminoacizi etc.) sînt prezenți ca atare în mediu și microorganismele îi dirijează direct în căile biosintetice (fig. 64). La microorganismele chemoorganotrofe, acești

compuşi sînt formaţi în cursul degradării unor compuşi organici mai complecşi în metabolismul energetic, producător de ATP, din care rezultă o gamă largă de compuşi cu 2, 3, 4 şi 5 atomi de C, care pot fi preluaţi de căile biosintetice.

Cel mai frecvent însă, mediul nu poate furniza întreaga gamă de compuşi cu g.m. mică necesari biosintezelor şi, ca urmare, unii, iar în unele cazuri, chiar toţi, trebuie produşi de microorganisme, din moleculele mici accesibile din mediu.

METODE DE STUDIU ALE CĂILOR BIOSINTETICE

Ca şi în alte cazuri, microorganismele s-au dovedit modele experimentale foarte adecvate pentru studiul biochimic al căilor de biosinteză, deoarece cresc şi fac biosinteze foarte rapid, au — în unele cazuri — capacitatea de a face sinteza tuturor constituenţilor celulari şi evoluează sub forma unor populaţii cu grad mare de omogenitate.

Studiul mutantelor auxotrofe. Izolarea primelor mutante auxotrofe de către Beadle şi Tatum (1941) a furnizat o tehnică genetică de evidenţiere a intermediarilor biosintetici şi de acumulare a lor în mediu. Studiile efectuate pe *Neurospora crassa* au permis izolarea unor mutante, care au pierdut capacitatea de a face sinteza unei singure enzime ce mediază o etapă specifică din calea biosintetică. Din aceasta, pentru a asigura creşterea, decurge necesitatea prezenţei în mediu a produsului căii respective, pe care celula parentală „sălbatică" sau „prototrofă" îl poate sintetiza *de novo*. Cele mai multe mutante de acest fel acumulează şi/sau excretă în mediu substratul reacţiei blocate în cantităţi mari, care uneori depăşesc greutatea celulelor (Davis şi colab., 1969). Mutantele auxotrofe pot creşte nu numai în prezenţa produsului final al căii blocate, ci adeseori şi atunci cînd mediul conţine intermediari între reacţia blocată şi produsul final.

Datorită acestor particularităţi, tulpinile mutante, cu reacţii blocate în diferite etape ale aceleiaşi căi de biosinteză, prezintă fenomenul de sintrofism, deoarece tulpina cu o reacţie blocată tardiv acumulează un intermediar la care poate răspunde tulpina blocată precoce. Acest răspuns nutriţional demonstrează posibilitatea acumulării unui compus important şi furnizează bazele analizei lui cantitative, dacă este necesar să fie izolat.

Studiul reacţiilor enzimatice. Utilizarea mutantelor auxotrofe, oferind posibilitatea acumulării intermediarilor unor căi, a făcut posibilă izolarea şi caracterizarea enzimelor care participă în evoluţia căilor enzimatice respective şi evidenţierea indirectă a unor intermediari care nu sînt revelaţi prin acumulare.

Izolînd o serie de mutante auxotrofe, afectate în diferite puncte ale unei căi complexe de biosinteză se poate reconstitui secvenţa reacţiilor care caracterizează calea respectivă, în funcţie de natura chimică a substraturilor de care celulele mutante au nevoie şi de natura substraturilor eliminate în mediu şi a enzimelor prezente.

Utilizarea radioizotopilor pentru descifrarea căilor de biosinteză ale microorganismelor se face pe două căi:

1) Reacţiile de competiţie izotopică furnizează celulelor un precursor posibil (spre exemplu, glicina) marcat cu izotopi, în competiţie cu un substrat

nemarcat, cum este glucoza, utilizat ca sursă de C, în general. Izolarea de purine intens marcate, prin hidroliza celulelor, demonstrează că glicina a servit ca precursor direct pentru biosinteză.

2) A doua categorie de tehnici utilizează o sursă unică de C (de exemplu, glucoza) marcată selectiv la anumiţi atomi. Produsul final este izolat şi degradat în aşa fel încît se poate stabili concentraţia izotopului (activitatea specifică) în atomii săi individuali. Pe această cale, cunoscînd modul de aranjare a atomilor individuali în substratul energetic, se poate demonstra frecvent dacă o cale de biosinteză se ramifică de la un intermediar al căii glicolitice, de la acetat sau de la un intermediar al ciclului Krebs.

Experienţele cu radioizotopi au permis descoperirea „familiilor" de aminoacizi şi a căilor lor de sinteză. Astfel s-a demonstrat că acidul glutamic marcat cu ^{14}C nu este încorporat în celulă numai ca atare, ci şi sub forma resturilor a doi aminoacizi diferiţi, arginina şi prolina. În felul acesta s-a evidenţiat pentru prima dată că „scheletul" de C al acidului glutamic serveşte ca precursor biosintetic pentru arginină şi prolină. De asemenea, ele s-au dovedit foarte utile în descifrarea reacţiilor biosintetice în sistemele acelulare, în care viteza reacţiilor este prea mică pentru a permite detectarea produşilor finali prin analize chimice uzuale.

Conceptul de intermediar biosintetic. Studiul căilor de biosinteză ale microorganismelor a avut şi unele consecinţe de ordin teoretic legate, între altele, de definirea unor concepte esenţiale pentru înţelegerea metabolismului. Astfel, substanţele provenite din mediul extern şi încorporate în structura constituenţilor celulari sînt denumite *precursori*. Dovada calităţii de precursor poate fi făcută fie prin asimilarea moleculelor marcate cu izotopi, fie prin activitatea de factor de creştere pentru o bacterie auxotrofă. Deşi mulţi precursori pot deveni intermediari în biosinteză, există şi numeroase excepţii.

În cazul secvenţei de biosinteză → →A → B → P, compuşii A şi B au calitatea de intermediari obligatorii în biosinteza produsului final P dacă: 1) compuşii A şi B pot, fiecare, da naştere produsului P în celule sau în extracte de celule; 2) o singură enzimă îl converteşte pe A în B; 3) pierderea unei enzime a căii de biosinteză prin mutaţie duce la nevoia prezenţei produsului P în mediu.

Cînd un intermediar de biosinteză, spre exemplu un aminoacid, este adăugat în mediul de cultură al unei bacterii el împiedică, de regulă, producerea lui endogenă (intracelulară). Compusul prezent în mediu este încorporat preferenţial în structura constituenţilor celulari. În cazul în care este marcat cu un radioizotop, el este regăsit în structura constituenţilor celulari.

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A BACTERIILOR

Rezultatul activităţii de biosinteză este reflectat în compoziţia chimică a bacteriilor care a făcut obiectul a numeroase studii în ultimii ani. S-a demonstrat astfel că, compoziţia chimică a celulei bacteriene este controlată genetic în ceea ce priveşte numărul şi diversitatea, atît ale macromoleculelor, cît şi ale unor molecule mici corelate funcţional cu acestea. Genotipul unei celule nu determină însă un fenotip unic, invariabil, ci permite o gamă destul de largă

de variații fenotipice în funcție de factorii din mediu care inhibă, accelerează sau chiar blochează fluxul de informații transmis de la genomul bacterian la restul dispozitivelor funcționale ale celulei. Ca urmare, o bacterie crescută într-un anumit mediu poate diferi mult în ceea ce privește compoziția sa cantitativă în proteine, glucide, lipide etc. de o celulă genetic identică, dezvoltîndu-se într-un mediu diferit. Această comportare se datorește faptului că formarea fiecărui component celular este dirijată prin mecanisme de control care coordonează biosinteza în raport cu condițiile mediului și cu necesitățile vitale ale celulei și, prin aceasta, asigură ordinea internă de care depinde

Tabelul nr. 22

Compoziția chimică a unei celule de *Escherichia coli* în faza de diviziune activă*)
(după Watson, 1977)

Constituentul	% față de greutatea totală	Greutatea moleculară medie	Numărul aproximativ de molecule într-o celulă	Numărul de tipuri de molecule diferite
H_2O	70	18	4×10^{10}	1
Ioni anorganici Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++} Fe^{++}, Cl^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-} etc.	1	40	$2{,}5 \times 10^8$	20
Glucide și precursori	3	150	2×10^8	200
Aminoacizi și precursori	0,4	120	3×10^7	100
Nucleotide și precursori	0,4	300	$1{,}2 \times 10^7$	200
Lipide și precursori	2	750	$2{,}5 \times 10^7$	50
Diferite molecule mici (hem, chinone, produși de degradare a substanțelor nutritive)	0,2	150	$1{,}5 \times 10^7$	200
Proteine	15	40 000	10^6	2 000–3 000
ADN cromosomal**)	1	$2{,}5 \times 10^9$	4	1
ARN	6			
ARNr 16 S		500 000	3×10^4	1 (?)
ARNr 23 S		1 000 000	3×10^4	1 (?)
ARNt		25 000	4×10^5	40
AR Nm		1 000 000	10^3	1 000

*) Greutatea calculată a unei celule bacteriene = 10^{12} daltoni.

**) Frecvent se pot găsi în plus una sau mai multe molecule de ADN de același tip sau de tipuri diferite, corespunzînd plasmidelor.

o creștere echilibrată. Aceste mecanisme de control nu impun o schemă rigidă de biosinteză, ci, dimpotrivă, permit o desfășurare suplă a diferitelor procese fiziologice în funcție de condițiile oferite de mediu în fiecare moment.

Cea mai mare parte dintre substanţele organice celulare este formată din molecule relativ mari de tipul macromoleculelor periodice (polizaharide, peptidoglican), al macromoleculelor informaţionale şi lipidelor complexe, la care se adaugă constituenţi organici de tipul coenzimelor care participă în diferite procese catalitice, în asociere cu enzimele specifice. Pe baza datelor actuale se apreciază că o celulă de *E. coli* ar conţine între 3 000 şi 5 000 de tipuri de molecule diferite. Aproape jumătate din acest număr ar reprezenta molecule „mici" (cu greutate moleculară mică), dintre care unele sînt foarte simple, ca H_2O şi CO_2, iar altele mult mai complexe, constituind o adevărată rezervă de metaboliţi gata de folosire, cum ar fi zaharuri, cei 20 de aminoacizi naturali, acizi organici, nucleotide, esteri fosforici, coenzime etc. Restul moleculelor ar consta din diferite macromolecule, ca aproximativ 200 de tipuri de glucide complexe şi precursori de glucide, 50 de tipuri de lipide, 10^6 molecule-proteină (2 000—3 000 tipuri diferite), un tip de ADN cromosomal, un număr mare de molecule ARN etc. (tabelul nr. 22).

PARTICULARITĂŢILE GENERALE ALE METABOLISMULUI DE BIOSINTEZĂ

Studiul metabolismului de biosinteză, efectuat în special la *E. coli*, a demonstrat că formarea diferiţilor constituenţi celulari se realizează prin asamblare treptată, pornind de la precursori organici cu greutate moleculară mai mică. Numărul minim al compuşilor organici cu greutate moleculară mică folosiţi de microorganisme, fie ca precursori ai macromoleculelor, fie direct cu rol de constituenţi celulari este de ~ 100—200. Sinteza lor se realizează pornind de la un număr mult mai mic de *metaboliţi intermediari*, produşi ai căilor centrale ale metabolismului celular, care contribuie la formarea „scheletului" carbonic al celor mai mulţi constituenţi celulari şi de la care pornesc căile biosintetice primare, ce asigură formarea precursorilor macromoleculelor (fig. 65).

Sinteza macromoleculelor. Unele macromolecule, şi anume acelea care au în special rol de rezervă sau structural, rezultă din asamblarea într-un agregat cu configuraţie liniară a unui număr mare de monomeri de tip uniform. Altele însă, cum sînt în special acizii nucleici şi proteinele, sînt polimeri*) neuniformi sau macromolecule codificate, alcătuiţi din 4, respectiv 20 de unităţi de construcţie (baze purinice şi pirimidinice, respectiv aminoacizii naturali), avînd un înalt grad de specializare structurală. Formarea unor asemenea tipuri de polimeri implică existenţa unor mecanisme foarte eficiente şi sigure de alegere şi ordonare corectă într-o anumită succesiune (secvenţă) a subunităţilor şi se realizează sub control genetic, graţie intrării în acţiune a unei molecule care funcţionează ca matriţă sau „template". Datorită nivelului lor superior de aranjare conform unei informaţii

---

*) Termenii *monomer* şi *polimer* sînt folosiţi în accepţiunea curentă din biologie. În chimie, denumirea de monomer este rezervată unităţilor structurale respective, cu masă moleculară mică, din macromolecula polimerului, iar polimerul este un compus format din unirea chimică a doi sau mai mulţi monomeri.

complexe, macromoleculele codificate pot fi considerate ca prezentînd o anumită specificitate, deci ca avînd o semnificație biologică foarte precisă, în sensul că sînt, la rîndul lor, purtătoare de informație.

În felul acesta, specificitatea biologică pare să fie bazată pe variații pe o temă comună, și anume pe aranjarea diferită a cîtorva unități fundamen-

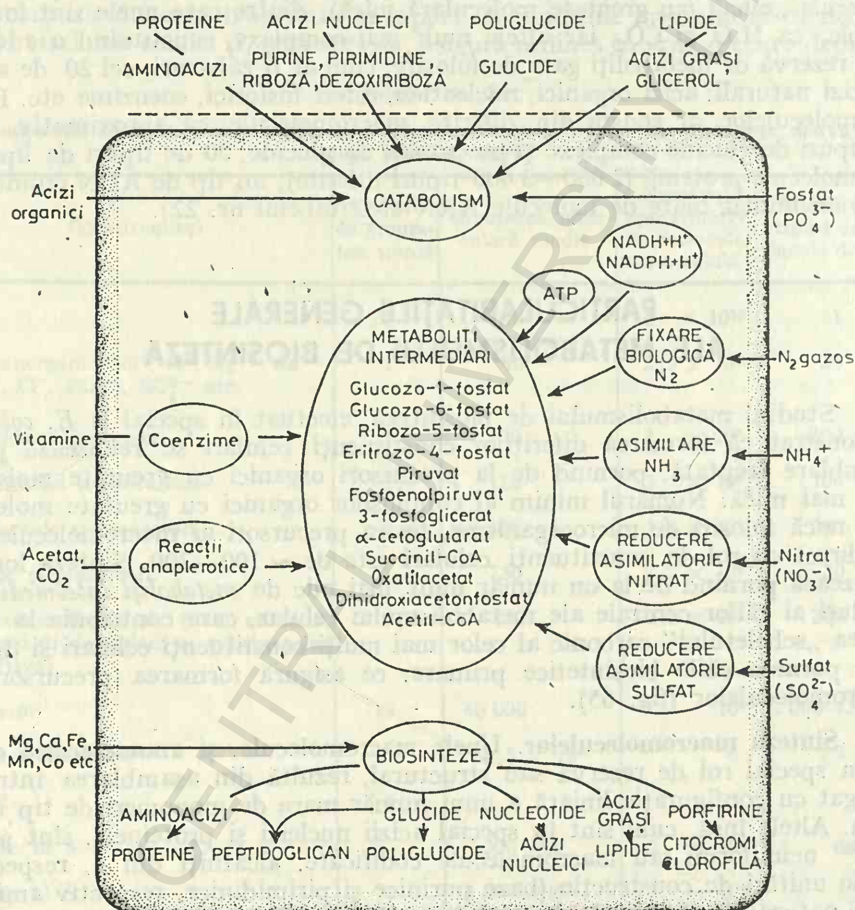


Fig. 65. — Reprezentarea schematică a poziției metaboliților intermediari în ansamblul căilor de catabolism și biosinteză.

tale care se repetă într-o structură polimerică. După cum arată Watson (1977), construcția polimerilor pornind de la monomeri, ca și utilizarea unor polimeri ca subunități pentru a forma polimeri și mai mari reflectă un principiu general aplicat în construcția structurilor complexe vii și neanimate (fig. 66). Acest mod de construcție este mai simplu și mai sigur, deoarece permite reducerea efectelor unor greșeli de construcție prin îndepărtarea monomerilor „greșiți" de la încorporarea în polimerul final.

Pentru a exemplifica acest principiu, Watson arată că pentru constituirea unei macromolecule de 1 milion de atomi există două posibilități: fie fie construirea ei atom cu atom, fie sinteza prealabilă a 1 000 de unități mai mici (monomeri), fiecare a cîte 1 000 de atomi, urmată de asamblarea lor într-un polimer. Dacă se presupune că în procesul de sinteză, erorile care

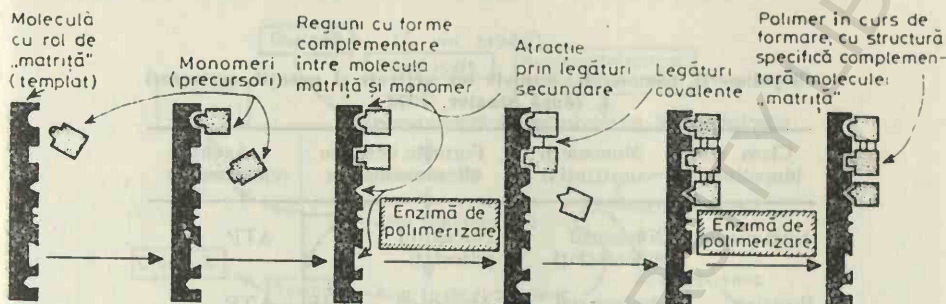


Fig. 66. — Formarea unei macromolecule specifice de polimer, prin aranjarea ordonată a monomerilor din constituția ei, pe o suprafață acționînd ca matriță (după Watson, 1977).

determină apariția unui produs nefuncțional se produc la întîmplare, inserarea unui alt atom decît cel adecvat avînd, de exemplu, o frecvență de 10^{-5}, rezultă că dacă se urmează prima schemă de construcție (atom cu atom), fiecare moleculă sintetizată va conține în medie 10 atomi „nepotriviți" și astfel, practic, nu se face sinteză de produși utili. Dacă însă, biosinteza se face după cel de-al doilea model, erorile apar numai în 1 % din subunități și ele sînt eliminate din polimerul final, grație specificității enzimelor care fac polimerizarea: aceste enzime nu „recunosc" monomerii nefuncționali din cauza erorii și nu îi încorporează în structura macromoleculei.

Un alt avantaj decurge din faptul că biosinteza unor polimeri pe baza asamblării unui număr mare de subunități identice oferă posibilitatea unei mari economii de material genetic. Teoretic, biosinteza unei proteine foarte mari, însumînd, spre exemplu, 100 000 de resturi de aminoacizi, ar necesita prezența unei molecule de ADN lungă de 300 000 perechi de baze. Dacă această moleculă este construită din 1 000 polipeptide identice, avînd fiecare 100 de resturi de aminoacizi, sinteza ei poate fi asigurată de un segment de ADN, lung de numai 300 perechi de baze: informația genetică cuprinsă în el ar fi utilizată repetat, pentru a sintetiza subunități identice, realizînd o mare economie de informație genetică. În sfîrșit, acest mod de construcție facilitează activitatea multor sisteme supramoleculare, care în cursul funcționării lor suferă modificări rapide conformaționale sau reacții de asociere și disociere. Aproape toate aceste tipuri de procese biologice foarte rapide au ca suport molecular disocierea și reasocierea necovalentă a subunităților componente sau modificări necovalente în conformația acestora. Or, interacțiunile hidrofobe și formarea și desfacerea legăturilor de H se realizează practic — prin însăși natura lor — mult mai rapid decît modificările covalente catalizate de enzime și sînt din punctul de vedere energetic, mult mai puțin costisitoare.

În prealabil, monomerii fiecărei clase majore de polimeri sînt „activaţi" într-un mod caracteristic, prin legarea lor cu cheltuială de energie, de molecule speciale, după care are loc încorporarea lor într-un polimer care crește. Asamblarea polimerilor se face prin adiţia secvenţială de noi subunităţi, printr-un tip special de legătură, la un capăt al lanţului care crește, în general, unidirecţional (tabelul nr. 23). Unii polimeri (proteine, acizi nucleici) sînt totdeauna structuri lineare, în timp ce alţii (glicogen) sînt ramificaţi, dar ramificarea este un eveniment secundar, decurgînd dintr-o aranjare iniţială lineară a subunităţilor.

Tabelul nr. 23

Biopolimerii, monomerii, formele lor activate și agenţii activatori (după Stanier, 1976)

Clasa de biopolimeri	Monomerii constitutivi	Formele activate ale monomerilor	Agenţii activatori
Acizi nucleici	Nucleozid monofosfaţi	Nucleozid trifosfaţi	ATP
Proteine	Aminoacizi	Aminoacil — AMP →Aminoacil ARNt	ATP ARNt
Polizaharide	Zaharuri	Zahar—NDP (nucleozid difosfat)	NTP (nucleozid trifosfat)

Cu excepţia anumitor cazuri particulare, căile biochimice folosite de microorganisme pentru a sintetiza aminoacizi, baze purinice și pirimidinice, diferite lipide și carbohidraţi sînt obișnuit aceleași care au fost descrise la *E. coli*, deoarece nu există o mare diversitate în ceea ce privește natura produșilor intermediari implicaţi în sinteza acestor compuși. Există deci un set relativ restrîns și constant de reacţii de biosinteză la bacterii, dar, în același timp, după cum s-a demonstrat, există o mare variaţie în structura și proprietăţile sistemelor enzimatice implicate: enzimele care catalizează același tip de reacţie la diferite bacterii nu sînt identice, ci au greutăţi moleculare, proprietăţi fizice și chimice diferite.

Numărul căilor biosintetice este mult mai mic decît cel al produșilor lor, datorită faptului că cele mai multe dintre ele sînt ramificate și, ca urmare, fac posibilă formarea unui număr important de produși de biosinteză diferiţi, prin deviere terminală de la o singură cale biosintetică primară (fig. 67).

Procesele biosintetice care necesită energie sînt cuplate obligatoriu cu cele de producere de ATP, în așa fel încît reacţia exergonică este cuplată ireversibil în direcţia biosintezei. În mod obișnuit, căile de biosinteză nu sînt identice cu cele urmate în catabolism. Ele pot avea mai multe trepte identice, dar totdeauna există cel puţin o treaptă enzimatică diferită în căile anabolice și cele degradative, care duc la sau de la o biomoleculă. Această comportare asigură existenţa unor structuri biologice stabile. În lipsa ei, echilibrul dintre precursori și produși, mediat prin sisteme de reacţii reversibile nestingherite, ar schimba prin efecte de acţiunea maselor cantitatea de macromolecule ori de cîte ori ar fluctua concentraţia precursorilor (Pelczar, 1977).

Reglarea reacțiilor de biosinteză este independentă de cea a căilor de catabolism, deoarece enzimele de reglare care controlează rata căii catabolice nu participă în calea de biosinteză. Căile biosintetice sînt reglate în special prin concentrația produsului lor final: bacteria sintetizează numai acel produs care îi este necesar la un moment dat și pe care nu îl găsește ca atare în mediu.

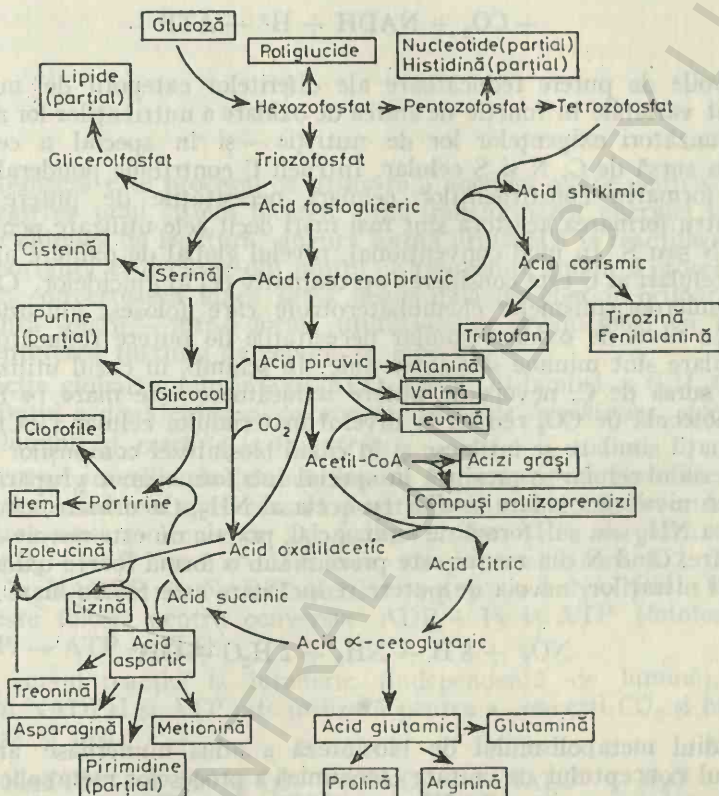
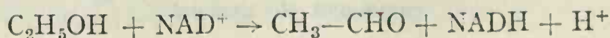


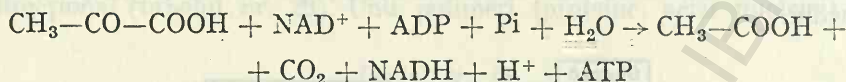
Fig. 67. — Hartă metabolică generalizată, prezentînd căile de obținere a constituenților organici majori ai microorganismelor și produșii-cheie ai metabolismului intermediar al glucozei (după Stanier, 1976).

Nevoia de putere reducătoare. Procesele biosintetice sînt condiționate, pe lîngă aportul net de energie sub formă de ATP, de o nevoie variabilă de putere reducătoare, corelată cu diferența dintre starea de oxidare a nutrienților utilizați pentru biosinteză și cea a produșilor finali ai acesteia. Transferul de putere reducătoare de la metabolismul producător de energie la reacțiile biosintetice reducătoare este mediat de două molecule-purtător, NADH și NADPH. Generarea de putere reducătoare în cursul metabolismului energetic se realizează prin transferul de electroni de la compușii oxidabili la NAD^+, respectiv la $NADP^+$. Un exemplu tipic este furnizat de reacția:



$$C_2H_5OH + NAD^+ \rightarrow CH_3{-}CHO + NADH + H^+$$

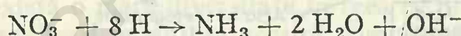
În unele cazuri, aceeași secvență catabolică poate produce formarea de ATP, ca și de NAD(P)H, așa cum se întîmplă în cursul oxidării acidului piruvic la acid acetic, una din reacțiile centrale de degradare oxidativă a substanțelor organice:



$$CH_3{-}CO{-}COOH + NAD^+ + ADP + Pi + H_2O \rightarrow CH_3{-}COOH + CO_2 + NADH + H^+ + ATP$$

Nevoile de putere reducătoare ale diferitelor categorii de microorganisme sînt variabile în funcție de starea de oxidare a nutrienților lor majori — corespunzători exigențelor lor de nutriție — și în special a celor care servesc ca sursă de C, N și S celular. Întrucît C contribuie ponderal cel mai mult la formarea constituenților celulari, necesitățile de putere reducătoare pentru formarea acestora sînt mai mari decît cele utilizate pentru compușii cu N sau S. În mod convențional, nivelul global de oxidare al componenților celulari ai C este considerat aproximativ cel al glucidelor. Ca urmare în cazul microorganismelor chemoheterotrofe care folosesc glucoza sau alt compus cu nivel de oxidare similar necesitățile de putere reducătoare pentru asimilare sînt minime sau chiar nule. În schimb, în cazul utilizării CO_2, ca unică sursă de C, nevoia de putere reducătoare este mare (4 H pentru fiecare moleculă de CO_2 redusă la nivelul materialului celular ($<CH_2O>$)).

Situații similare se întîlnesc și în cazul biosintezei compușilor cu N, în care materialul celular se prezintă în special sub forma unor grupări $-NH_2$, deci cu un nivel de oxidare similar cu acela al NH_3. Ca urmare, cînd N este furnizat ca NH_3 sau sub formă de aminoacizi, practic nu este nevoie de putere reducătoare. Cînd N din mediu este prezent sub o formă foarte oxidată, cum este cazul nitraților, nevoia de putere reducătoare este foarte mare:



$$NO_3^- + 8\,H \rightarrow NH_3 + 2\,H_2O + OH^-$$

★

Studiul metabolismului de biosinteză a adus numeroase argumente în sprijinul conceptului de unitate biochimică a proceselor metabolice formulat pentru microorganisme de Kluyver (1929). S-a demonstrat că simplitatea exigențelor nutritive nu implică simplitatea mecanismelor biochimice și că, în toate celulele, creșterea depinde de prezența a aproximativ aceluiași set de blocuri de construcție și de cofactori *(metaboliți esențiali)*. Microorganismele diferă în capacitatea lor de a face sinteza acestor metaboliți esențiali. Cei care nu pot fi sintetizați intracelular trebuie preluați ca atare din mediu, sub formă de *nutrienți esențiali* sau *factori de creștere*. Conceptul a fost extins de la setul practic universal de metaboliți la demonstrarea existenței acelorași tipuri de macromolecule și a formării lor pe calea acelorași clase de reacții enzimatice, chiar în cazul microorganismelor cu o biologie foarte îndepărtată de ceea ce, în general, considerăm ca obișnuit.

FOTOSINTEZA

(Pl. 3–7)

Fotosinteza este procesul de utilizare a energiei solare pentru menținerea și creșterea unui sistem biologic prin transformarea energiei luminoase în energie chimică de legătură, singura formă utilizabilă în reacțiile de biosinteză. Importanța ei decurge din faptul că reprezintă singurul proces biologic capabil să convertească unica sursă disponibilă de energie primară — energia radiantă solară — într-o formă utilizabilă de organismele vii, asigurînd astfel menținerea fluxului de energie în biosferă.

Reacția globală a fotosintezei ($6\ CO_2 + 6\ H_2O +$ lumină $\rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$) este rezultatul a două categorii de procese: *reacțiile fotochimice* efectuate cu ajutorul luminii și *reacțiile la întuneric*.

În cursul reacțiilor la lumină, fotonii „capturați" de clorofilă și ceilalți pigmenți funizează energia necesară pentru fotoliza a două molecule de apă, cu formarea unei molecule de O_2, patru protoni (H^+) și patru electroni: $2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$. Simultan, cei patru electroni și $2\ H^+$ reduc $NADP^+$ la NADPH: $2\ NADP^+ + 2\ H^+ + 4\ e^- \rightarrow 2\ NADPH$. Restul de energie este folosit pentru conversia ADP + Pi la ATP (fotofosforilare): $ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$.

În cursul reacției la întuneric (independentă de lumină), energia stocată în NADPH și ATP este utilizată pentru a converti CO_2 și hidrogenul în glucoză și apă:



$$2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2 \rightarrow [CH_2O] + 2\ NADP^+ + H_2O$$



$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi$$

În această reacție, NADPH furnizează toți electronii și jumătate din hidrogenul necesar (fig. 68).

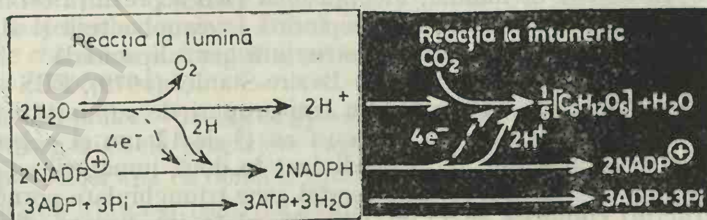


Fig. 68. — Reprezentarea schematică a reacțiilor la lumină și la întuneric ale fotosintezei.

Capacitatea de a utiliza direct energia din radiațiile luminii cu ajutorul fotosintezei este întîlnită în lumea microorganismelor la algele microscopice și la mai multe grupuri fiziologice de bacterii predominant acvatice.

PROCARIOTELE FOTOTROFE

Sub denumirea de *Photobacteria*, Gibbons și Murray (1974) au reunit totalitatea organismelor procariote capabile de fotosinteză. În funcție de structura fină și moleculară a aparatului fotosintetic, de natura reacțiilor biochimice și a produsului lor final, bacteriile fototrofe pot fi grupate în două mari categorii, corespunzînd grupărilor: *Oxyphotobacteria* și *Anoxyphotobacteria*.

Grupul ***Oxyphotobacteria*** (Gibbons și Murray, 1978) include procariotele capabile de fotosinteză oxigenică, reprezentate de ordinul *Cyanobacteriales*, grupul *Prochlorophytes* și o categorie aparte, reprezentată de bacteriile halofile extreme din genul *Halobacterium (Archaebacteria)*.

Ordinul *Cyanobacteriales* („algele" albastre-verzi) formează cel mai mare, cel mai divers și cel mai larg răspîndit grup de procariote fotosintetizante. El cuprinde organisme care conțin într-o celulă procariotă un aparat fotosintetic foarte asemănător sub raport structural, molecular și funcțional celui prezent în cloroplastele celulelor eucariote. Conțin clorofila *a* și ficobiliproteine, avînd deci un sistem de pigmenți identic cu cel întîlnit în cloroplastele algelor roșii.

Aparatul fotosintetic prezintă două configurații caracteristice: 1) la cianobacteria unicelulară *Gloeobacter violaceus*, centrii de reacție și sistemul transportor de electroni sînt localizați în membrana citoplasmatică (Ripka și colab., 1974). Pigmenții antenei de absorbție a luminii — ficobiliproteinele — sînt localizați într-un strat subcortical continuu, în contact cu suprafața internă a membranei celulare. Toate celelalte cianobacterii prezintă un aparat fotosintetic intracelular sub forma unui sistem bine dezvoltat de saci membranoși sau *tilacoizi*, separați topologic de membrana celulară, care conțin centrii de reacție și sistemul transportor de electroni. Membrana citoplasmatică propriu-zisă nu conține nici un component al aparatului fotosintetic, deoarece acesta, ca și în cazul cloroplastelor, este în întregime situat intracelular. Suprafața externă a tilacoizilor este acoperită de *ficobilisomi*, structuri granulare așezate adesea în șiruri paralele.

Arhitectura moleculară a ficobilisomilor. Ficobilisomii sînt complexe supramoleculare de pigmenți — *ficobiliproteine* — care îndeplinesc rolul major de „antenă" colectoare de lumină. Ficobilisomii (FBS) prezintă cel mai frecvent o structură hemidiscoidală, larg răspîndită la cianobacterii și algele roșii și mai rar (numai la unele alge roșii) o structură hemielipsoidală.

După modelul lui Bryant și Cohen-Bazire-Stanier (1979), FBS au o regiune centrală triunghiulară, formată din trei grupuri de subunități în formă de disc. Fiecare grup conține două discuri cu Ø de 12 nm și o grosime de ~ 6—7 nm. Fiecare disc este probabil divizat în două jumătăți, cu grosimea de 3—3,5 nm. De la două din laturile acestei zone triunghiulare pornesc radial cîte trei structuri cilindrice cu Ø de ~ 12 nm, alcătuite, fiecare, din grupuri de 2—6 subunități în formă de disc, cu grosimea de ~ 6 nm. În unele cazuri, numărul discurilor variază în funcție de lungimea de undă a luminii, la care

bacteriile sînt expuse în timpul creşterii. Şi aceste discuri sînt subdivizate în jumătăţi cu grosimea de ~ 3 nm.

Zona centrală triunghiulară este formată din *aloficocianină*, iar „cilindrii" periferici din *ficocianină* şi *ficoeritrină*.

Reacţiile fotosintezei la cianobacterii sînt, în esenţă, aceleaşi ca şi la plantele superioare (Evans şi Whatley, 1970; Stanier şi colab., 1977, 1981). De aceea, ele vor fi descrise împreună cu cele ale microorganismelor eucariote, după modelul reacţiilor întîlnite la plantele superioare, respectiv corelate cu procesele de fotofosforilare ciclică şi neciclică şi cu reducerea $NADP^+$, utilizînd apa ca donator de electroni (Petrack şi Lipmann, 1961; Stanier şi Cohen-Bazire-Stanier, 1977).

Ordinul *Prochlorales*. Sub denumirea de *Prochlorophytes*, Lewin (1976) a descris o categorie aparte de procariote fototrofe, care conţin clorofilă *a* şi *b* şi produc oxigen prin fotosinteză, cînd sînt iluminate corespunzător. Considerate iniţial ca zoochlorele sau „alge" albastre-verzi (Newcomb, 1975), proclorofitele sînt bacterii aparţinînd ordinului *Prochlorales* (Gibbons şi Murray, 1978), deşi Lewin le consideră alge (similare algelor verzi eucariote, după compoziţia în pigmenţi), fără să ţină seama de organizarea lor celulară.

Singura specie descrisă, *Prochloron didemni*, este o bacterie sferică cu Ø 6—25 μm, asociată frecvent — în apele din zonele tropicale şi subtropicale — ca ectosimbiont cu unele specii de ascidii (*Didemnidae*). Este localizată în cavităţile cloacale sau în materialul tunicii, pe suprafaţa externă a coloniilor de animale sau aglomerate în scobiturile din jurul aperturii orale. Celulele de *Prochloron* sînt acoperite de o membrană externă verucoasă sau ondulată, tristratificată. Conţin tilacoizi liberi, neincluşi în plastide, aranjaţi diferit: dispersaţi în întreaga celulă, dispuşi concentric în zona externă a celulei (*cromoplasmă*), în jurul unei zone centrale clare (*centroplasma*), grupaţi cîte 2, 3 sau în „fişicuri" de ~ 20 elemente. Conţin un corp paracristalin, vizibil la microscopul fotonic, alcătuit din şiruri de molecule hexagonale cu Ø de 17,5 nm.

După Lewin (1981), *Prochloron* a luat naştere, probabil, dintr-o cianobacterie (ca *Synechocystis*), care a căpătat, prin mutaţie sau prin înglobarea unei plasmide, capacitatea de a face sinteza clorofilei *b*, dar a pierdut informaţia genetică necesară pentru sinteza ficobilinei.

Bacteriile halofile extreme (genul *Halobacterium*) nu sînt fototrofe în sensul strict al termenului, deoarece se pot dezvolta şi în absenţa luminii. Ele sînt chemoorganotrofe. Formează ATP prin procese de respiraţie oxigenică. În condiţii de limitare a concentraţiei de O_2, sinteza unei cromoproteine — bacteriorhodopsina — este derepresată, conferind bacteriei capacitatea de conversie a energiei luminoase (vezi cap. „Conversia energiei luminoase la *Halobacteria*").

Sub denumirea de ***Anoxyphotobacteria***, Gibbons şi Murray (1978) au reunit organismele procariote care fac fotosinteză anoxigenică (respectiv care nu pot folosi apa ca donator fotosintetic de electroni şi nu produc oxigen molecular) cu ajutorul bacterioclorofilelor, utilizînd în anaerobioză compuşi reduşi ai S, H_2 sau compuşi organici simpli, ca donatori de electroni. Pe baza diferenţelor în structura fină a aparatului fotosintetic şi a conţinutului

lor în pigmenți au fost grupate în două ordine: *Rhodospirillales* și *Chlorobiales* (tabelul nr. 24).

Ordinul *Rhodospirillales* (fotobacteriile purpurii) reunește bacterii care conțin bacterioclorofilele *a* și *b*, ca principali pigmenți fotosintetizanți și carotenoizi. Aparatul lor fotosintetic este în întregime încorporat în membrana citoplasmatică. Deoarece membrana are o grosime fixă și expansiunea ei externă este împiedicată de peretele celular rigid cînd celulele conțin cantități mari de pigmenți ea suferă invaginări, mai mult sau mai puțin profunde în citoplasmă, formînd structuri cu aspect variabil (lamelare, tubulare, veziculare) la diferitele tipuri de bacterii.

Tabelul nr. 24

Sistematica bacteriilor fototrofe anoxigene (Anoxyphotobacteria)

Ordinul	Familia	Genurile	Denumirile vechi și vernaculare
Rhodospirillales	*Rhodospirillaceae*	*Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium*	*Athiorhodaceae* (bacterii nesulfuroase purpurii)
	Chromatiaceae	*Chromatium, Thiocystis, Thiosarcina, Thiospirillum, Thiocapsa, Lamprocystis, Thiopedia, Thiodictyon, Ectothiorhodospira, Amoebobacter*	*Thiorhodaceae* (bacterii sulfuroase purpurii)
Chlorobiales	*Chlorobiaceae*	*Chlorobium, Prosthecochloris, Chloropseudomonas, Pelodictyon, Clathrochloris*	Bacterii sulfuroase verzi
	Chloroflexaceae	*Chloroflexus aurantiacus*	—

Ordinul *Rhodospirillales* este format din două familii: *Rhodospirillaceae* (bacteriile nesulfuroase purpurii, numite înainte *Athiorhodaceae*) și *Chromatiaceae* (bacteriile sulfuroase purpurii sau *Thiorhodaceae*).

Ordinul *Chlorobiales* (fotobacteriile verzi) este alcătuit, de asemenea, din două familii: *Chlorobiaceae* și *Chloroflexaceae*.

Familia *Chlorobiaceae* grupează bacterii fototrofe obligate, strict anaerobe, imobile, cu perete celular rigid, care conțin, pe lîngă cantități mici de bacterioclorofilă *a*, bacterioclorofilele *c*, *d* sau *e* și carotenoizi specifici (*clorobacten* la speciile verzi și *izorenieraten* la cele brune). Membrana citoplasmatică are o topologie simplă, cu excepția zonelor unde se formează mezosomii. La aceste bacterii, în mod foarte caracteristic, membrana plasmatică este sediul bacterioclorofilei *a*, al centrilor de reacție și al sistemului transportor de electroni (Olson, Prince și Brune, 1976). Pigmenții antenei care „recoltează" radiațiile luminoase sînt localizați însă în organite distincte,

ovoidale, situate în regiunea subcorticală în contact cu suprafaţa internă a membranei plasmatice, numite *clorosomi* sau *„vezicule de Chlorobium"*.

Familia *Chloroflexaceae* cuprinde bacterii flexibile, filamentoase „multicelulare", care se deplasează prin alunecare. Se dezvoltă fotolito- şi fotoorganotrof, dar şi chemoorganotrof (la întuneric), în prezenţa O_2, care represează formarea bacterioclorofilelor şi a clorosomilor). Conţin bacterioclorofilă *c*, ca pigment fototrof major, β-, γ-caroten şi derivaţii lor. Specia tip, *Chloroflexus aurantiacus*, a fost izolată din unele izvoare termale (Pierson şi Castenholz, 1974).

Metabolismul fotosintetizant al microorganismelor procariote prezintă o dihotomie în raport cu modul său de evoluţie, care este expresia unor diferenţe profunde în mecanismele fotochimice fundamentale şi anume: bacteriile fototrofe purpurii şi verzi fac o fotosinteză anoxigenică, în timp ce cianobacteriile („algele albastre-verzi"), ca şi toate organismele fototrofe de tip eucariot fac o fotosinteză mai complexă, oxigenică (avînd oxigenul molecular ca produs metabolic major). Această comportare sugerează că metabolismul fototrof a apărut şi a evoluat la procariote, iar versiunea lui terminală a fost ulterior transferată la anumite grupuri de eucariote.

MICROORGANISMELE FOTOSINTETIZANTE EUCARIOTE

Microorganismele eucariote au reprezentanţi fotosintetizanţi numeroşi în aproape toate grupurile majore de alge (de exemplu, în diviziunile *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Pyrrophyta*, *Chrysophyta* şi *Rhodophyta*), la care sinergomul fotosintezei este localizat la nivelul unor organite specifice — *cloroplastele*. Cele mai multe informaţii provin din studiul cloroplastelor plantelor superioare, dar, ţinînd seama de marea asemănare de structură şi funcţie, aceste date pot fi, cu anumite limite, extrapolate la fotosinteza oxigenică a microorganismelor eucariote (fig. 69).

Cloroplastele sînt organite cu formă elipsoidală, avînd dimensiunea de 4—6 μm × 1,0—2,0 μm şi o structură complexă. Sînt delimitate la exterior de un înveliş dublu (membrana externă şi internă), cu grosimea de 30 nm, care conţine galactolipide, fosfatidilcolină, sulfolipide, carotenoizi şi proteine avînd rol în fenomenele de transport şi în sinteza galactolipidelor (fig. 70). Învelişul cloroplastului delimitează un spaţiu intern, ocupat pe stromă şi de un sistem complex de membrane.

Stroma, bogată în proteine solubile (~ 0,4 g/ml) are un aspect granular, datorită ribosomilor 70 S pe care îi conţine, şi consistenţa unui gel. Ea conţine ADN, ARN şi, dintre proteine, în special ribulozo-1,5-difosfat carboxilaza, enzima-cheie a ciclului Calvin. Datorită acestei compoziţii, cloroplastele au un oarecare grad de autonomie reprezentat, pe lîngă capacitatea de a desfăşura activităţile ciclului Calvin şi sinteza unor molecule C_3 fosforilate, şi pe aceea de a sintetiza acizi graşi, amidon şi în special unele proteine, utilizînd informaţia genetică proprie.

În interiorul stromei se găseşte sistemul complex de membrane pliate numite *lamele* care formează structuri *(grane)* alcătuite din grămezi dense de saci membranoşi, *tilacoizii*. Ei reprezintă unităţile structurale de bază ale

lamelelor. Un tilacoid avînd grosimea medie de ~ 10 nm este format dintr-o pereche de lamele, închise la extremități. Un cloroplast conține ~ 50 grane, fiecare fiind alcătuită din 10—60 de lamele. Ansamblul tilacoizilor unui cloroplast formează o suprafață membranară de ~ 500 de ori mai mare decît suprafața învelișului extern.

Grupul taxonomic	Localizarea, Pigmenții antenei colectoare	Centrii de reacție și sistemul transportor de electroni	Repartizarea schematică a structurii fine a aparatului fotosintetic
Rhodospirillales (fotobacteriile purpurii)	Membrana celulară	Membrana celulară	Pc, mc
Chlorobiales (fotobacteriile verzi)	Clorosomi	Membrana celulară	Pc, mc, cs
Cyanobacteria Gloeobacter	Stratul subcortical	Membrana celulară	Pc, mc, ssc
Cyanobacteria (toate celelalte specii)	Ficobilisomi	Membrana tilacoizilor	Pc, mc, tc, fbs
Rhodophyta (cloroplaste)	Ficobilisomi	Membrana tilacoizilor	mec, fbs, tc
Chlorophyta (cloroplaste)	Membrana tilacoizilor	Membrana tilacoizilor	mec, tc

Fig. 69. — Anatomia comparată a aparatului fotosintetic al procariotelor și cloroplastelor. Pc — peretele celular; mc — membrana citoplasmatică; tc — tilacoid; fls — ficobilisom; mec — membrana externă a cloroplastului, ssc—stratul subcortical (după Stanier, 1979).

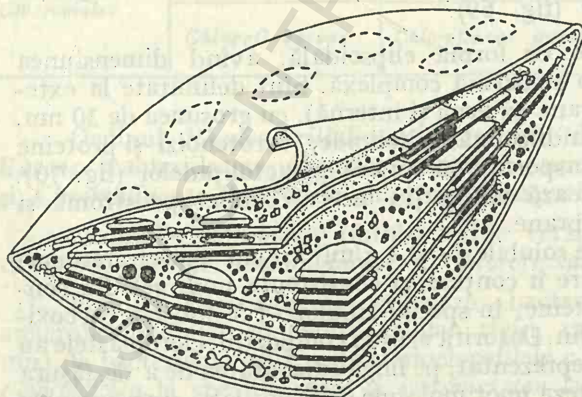


Fig. 70. — Model de structură al unui cloroplast. Între membranele fotosintetice se găsește stroma, care conține ribosomi, enzima fixatoare de CO_2, —ribulozo-difosfat carboxilaza—, alte enzime, molecule de ADN circular, purtătoare ale informației genetice a organitului.

Sistemele de membrane ale cloroplastelor delimitează trei compartimente: *spațiul intermembranar* (între cele două membrane ale învelișului), *spațiul intern* (care conține stroma (delimitată de membrana internă a învelișului) și *spațiul intralamelar* (spațiul intern al tilacoidului). Tilacoizii conțin

galactolipide, fosfatidilglicerol, sulfolipide, clorofile, pigmenţi carotenoizi şi componenţii lanţului transportor de electroni. Ei reprezintă sediul reacţiilor fotochimice primare care transformă energia luminoasă în energie chimică, utilizată apoi în stromă pentru fixarea şi asimilarea CO_2, sub formă de zaharuri.

Deci, în cloroplaste, reacţiile la lumină şi cele la întuneric sînt separate nu numai funcţional, ci şi spaţial: primele au loc în mediul lipidic membranar, celelalte în mediul apos al stromei. Utilizînd tehnica replicilor după îngheţare—fracturare, Miller (1979) a demonstrat, prin examinare la microscopul electronic, structura diferită asimetrică a suprafeţelor internă şi externă ale membranelor tilacoidale, evidenţiind substructurile corespunzătoare ATP-azei („factorul cuplant") — sub forma unor particule cu Ø de 12 nm, care proemină pe suprafaţa externă a tilacoidului. De asemenea, a evidenţiat sistemul de pigmenţi II, sub forma unor particule mai neregulate, cu Ø global de 18 nm, alcătuite din 4 sau mai multe subunităţi, care traversează membrana tilacoidului, putînd fi recunoscute atît pe suprafaţa externă, cît şi pe suprafaţa internă. Constituenţii sistemului de pigmenţi I ar fi localizaţi într-o serie de particule mai mici, prezente, de asemenea, în membranele fotosintetizante.

Diversitatea structurii cloroplastelor. În timp ce la plantele superioare unii tilacoizi sînt grupaţi în grămezi caracteristice — grane — la algele verzi, ei formează, adesea, grămezi cu contururi mai neregulate. Unele alge unicelulare sau filamentoase au numai 1—2 cloroplaste/celulă. La *Spirogyra*, cele două cloroplaste din fiecare celulă au aspectul unor panglici spiralate, în timp ce la *Zygnema* au o formă stelată. La algele roşii, la care tilacoizii sînt toţi separaţi unii de alţii, culoarea verde a clorofilei este mascată de pigmenţii roşii de natură proteică din structura ficobilisomilor. În plus, stroma cloroplastelor algale conţine adesea una sau mai multe incluziuni refringente — *pirenoizii* — constituiţi din material granular înconjuraţi uneori de granule de amidon şi traversaţi de tilacoizi.

STRUCTURA MOLECULARĂ A APARATULUI FOTOSINTETIC

Procesul complex de conversie fotosintetică a energiei are loc la nivelul aparatului fotosintetic, reprezentat — după cum am arătat — dintr-un sistem de membrane (cloroplaste sau structuri derivate din membrana plasmatică), care conţin pigmenţi, transportori de electroni, proteine şi lipide.

Din punctul de vedere funcţional, aparatul fotosintetic este alcătuit la nivelul molecular din trei componenţi majori: 1) „*antena colectoare*" care conţine pigmenţi capabili să „recolteze" radiaţiile luminoase; 2) un număr limitat de „centri de reacţie" fotochimică, reprezentaţi de molecule de clorofilă aflate într-o stare specială, la nivelul cărora au loc fenomenele centrale ale fotosintezei şi 3) un *lanţ transportor de electroni*, capabil să accepte electroni de la centrul de reacţie şi să cedeze electroni. Centrii de reacţie şi lanţul transportor de electroni sînt totdeauna asociaţi cu structurile membranare, care sînt şi sediul antenei la cele mai multe fototrofe. Există însă şi excepţii (cum sînt fotobacteriile verzi), la care pigmenţii antenei sînt localizaţi separat, în clorosomi.

SISTEMELE DE PIGMENŢI FOTOSINTETIZANŢI

Microorganismele fototrofe dispun de un sistem complex de pigmenţi capabili să capteze şi să absoarbă radiaţiile luminoase. Dintre aceştia, clorofilele şi carotenoizii sînt componenţi universali ai sistemelor de pigmenţi fotosintetizanţi. Cianobacteriile şi unele alge posedă o a treia categorie de pigmenţi, ficobiliproteinele.

Clorofilele sint complexe porfirină—magneziu înrudite structural şi funcţional cu hemul (care serveşte ca grupare prostetică pentru hemoglobină, citocromi şi unele enzime ca peroxidaza sau catalaza) prin prezenţa nucleului central tetrapirolic (I, II, III, IV). Ele se deosebesc de hem prin mai multe proprietăţi: a) prezenţa unui ciclu suplimentar (V) ciclopentanon; b) prezenţa Mg în locul Fe; c) esterificarea unui acid propionic cu metanol şi a celui de-al doilea cu un lanţ de fitol, cu 20 atomi de C, format din 4 unităţi izoprenice.

Molecula de clorofilă apare constituită dintr-un „cap" porfirinic, hidrofil, care poate fi înscris într-un pătrat cu latura de 1,5 nm şi o „coadă" (fitol) lungă de 2,0 nm, hidrofobă. Cînd pigmentul absoarbe lumina, electronii circulă prin sistemul de legături simple şi duble ale ciclului, intrînd într-o stare de excitaţie consecutivă schimbării orbitalului. Caracteristicile fizice ale moleculelor de clorofile au importanţă în aranjarea şi legarea lor fermă în stratul lipidic al membranelor tilacoidale. „Coada" fitol-hidrofobă este inclavată în stratul lipidic extern hidrofob, acţionînd ca o ancoră moleculară. Capătul polar hidrofil (ciclul porfirinic) s-ar asocia cu proteinele membranare funcţionînd în timpul absorbţiei luminii ca un capăt activ al moleculei (fig. 71).

Există cel puţin 12 tipuri diferite de clorofile (Sălăgeanu şi Atanasiu, 1981), avînd aceeaşi structură de bază, dar care diferă prin prezenţa unor grupări chimice şi prin spectrul lor de absorbţie maximă. Cea mai studiată şi mai răspîndită în natură este clorofila *a*, de culoare verde, care transmite lumina verde şi absoarbe specific puternic lumina roşie ($\lambda \sim 665-670$ nm) şi albastră ($\lambda \sim 430-440$ nm) a spectrului. Ea este prezentă la plantele verzi ($\sim 80\%$ din pigmenţii clorofilieni), la algele eucariote şi dintre procariote la cianobacterii şi *Prochlorophytes*. Diferă de clorofila *b* prin prezenţa la atomul C_3 a unei grupări metil ($-CH_3$) în locul unei grupări aldehidă ($-CHO$).

Bacterioclorofilele. Bacteriile fotosintetizante conţin clorofile cu structuri specifice, numite de Jensen (1964) *bacterioclorofile* (notate cu *a*, *b*, *c*, *d*, şi *e*), care se deosebesc între ele prin anumite detalii de structură chimică şi prin spectrul de absorbţie maximă a luminii.

Bacterioclorofila a (fig. 72) este similară clorofilei *a*, de care se deosebeşte prin faptul că gruparea vinilică ($-CH{=}CH_2$) de la C_2 (nucleul pirolic I) este înlocuită cu o grupare acetil ($-\underset{\underset{C}{\|}}{O}-CH_3$) şi este mai redusă, avînd 2 H în plus, probabil la C_3 şi C_4 (nucleul pirolic II).

Celelalte tipuri de bacterioclorofile se deosebesc, de asemenea, de tipul *a*, prin substituirea unei grupări chimice cu alta specifică (tabelul nr. 25).

Spectrul de absorbţie maximă a clorofilelor este determinat, de regulă, pentru pigmenţii dizolvaţi în eter. În stare naturală, în celulele intacte, absorb-

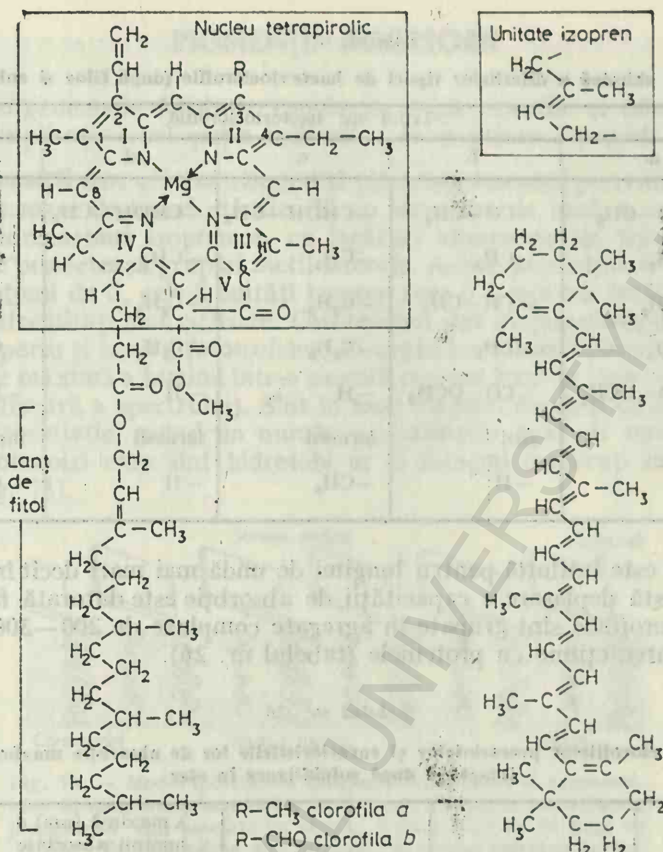


Fig. 71. — Structura clorofilelor și a β-carotinei

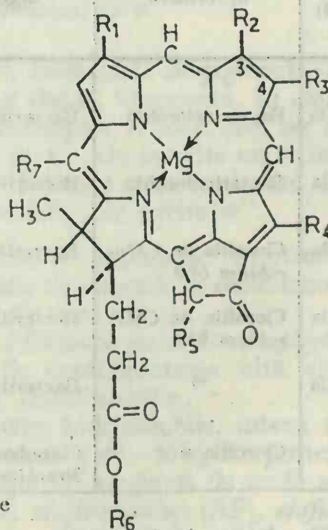


Fig. 72. — Structura chimică de bază a bacterioclorofilelor

Tabelul nr. 25

Structura chimică a diferitelor tipuri de bacterioclorofile (după Gloe și colab., 1975)

	Tipul de bacterioclorofilă				
	a	b	c	d	e
R_1	$-CO-CH_3$	$-CO-CH_3$	$-CHOH-CH_3$	$-CHOH-CH_3$	$-CHOH-CH_3$
R_2	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CHO$
R_3	$-C_2H_5$	$=CH-CH_3$	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$
R_4	$-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$
R_5	$-CO-OCH_3$	$-CO-OCH_3$	$-H$	$-H$	$-H$
R_6	fitil	fitil	farnesil	farnesil	farnesil
R_7	$-H$	$-H$	$-CH_3$	$-H$	$-CH_3$

ția maximă este întîlnită pentru lungimi de undă mai mari decît în extractul eteric. Această deplasare a capacității de absorbție este datorată faptului că în celule, clorofilele sînt grupate în agregate complexe de 200—300 de molecule și în interacțiune cu proteinele (tabelul nr. 26).

Tabelul nr. 26

Nomenclatura clorofilelor procariotelor și caracteristicile lor de absorbție maximă în celulele intacte și după solubilizare în eter

Denumirea actuală (Jensen, 1964)	Denumirea anterioară	Grupul taxonomic	λ maximă (nm) a luminii absorbite		Deplasarea (nm)
			Solubil în eter	Celule intacte	
Bacterioclorofila *a*	Bacterioclorofila	Bacteriile purpurii	775	850—910	75—135
Bacterioclorofila *b*	Bacterioclorofila *b*	Bacteriile purpurii	790	1 020—1 035	230—246
Bacterioclorofila *c*	Clorofila de *Chlorobium* 660	Bacteriile verzi	660	745	85
Bacterioclorofila *d*	Clorofila de *Chlorobium* 650	Bacteriile verzi	650	725	75
Bacterioclorofila *e*	—*)	Bacteriile verzi	—	710—725	—
Clorofila *a*	Clorofila *a*	Cianobacterii, *Prochlorophytes*	665	680—683	15—18

*) Absența datelor în literatură

PIGMENȚII ACCESORII

Microorganismele fototrofe conțin pe lîngă clorofile și alte tipuri de pigmenți, implicați — cel puțin indirect — în captarea energiei luminoase.

Carotenoizii sînt cei mai răspîndiți pigmenți accesorii prezenți sub forma unui număr mare de tipuri diferite. Ei au structura de bază a unor lanțuri lungi de hidrocarburi izoprenice, cu legături alternante de tipul C — C și C = C, care proiectează grupări metil laterale. Astfel, β-carotina este alcătuită din 40 de atomi de C, cele 8 unități izopren care o constituie formînd un lanț ale cărui extremități sînt ciclizate. Carotenoizii sînt răspunzători de colorarea în roșu-purpuriu și brun a fototrofelor. Ei conferă celulelor intacte capacitatea de absorbție maximă a luminii într-o singură regiune largă în zona 450—550nm (regiunea albastră a spectrului). Sînt în mod obișnuit asociați cu clorofilele în aparatul fotosintetic, avînd un număr aproximativ egal de molecule. Pigmenții carotenoizi care sînt hidrofobi ar fi integral inclavați în porțiunea lipidică (fig. 73).

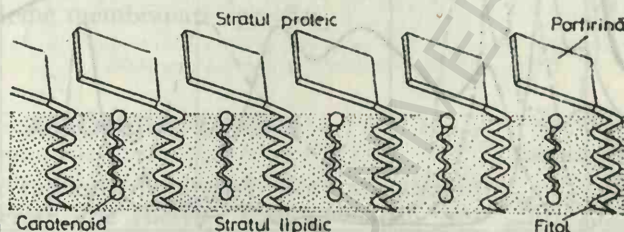


Fig. 73. — Model ipotetic de aranjare a clorofilelor și carotenoizilor în membrana lamelară a tilacoizilor. Grupările hidrofile ale porfirinelor sînt asociate cu stratul proteic hidrofil, în timp ce „cozile" fitol hidrofobe sînt inclavate în stratul hidrofob lipidic. Carotenoizii sînt hidrofobi și, probabil, localizați în stratul lipidic (după Govindjee și Govindjee, 1974).

După cum rezultă și din figura 71, moleculele de pigmenți sînt caracterizate ca un sistem de legături simple și duble, alternante. În clorofile, legăturile alternante sînt localizate în ciclul complex al porfirinei, iar la pigmenții carotenoizi într-un lanț linear de atomi de C, care are cîte un ciclu la fiecare extremitate. Cînd pigmentul absoarbe lumina, electronul care circulă de-a lungul sistemului trece într-o stare specială „de excitație".

Ficobiliproteinele. În cele mai multe organisme fototrofe captarea energiei luminoase este efectuată exclusiv de clorofile și carotenoizii integrați în sistemul de membrane al aparatului fotosintetic.

La cianobacterii și la unele alge *(Rhodophyta* și *Cryptophyta)*, această funcție este preluată în mare măsură de ficobiliproteine, altă clasă de pigmenți accesorii, localizați în structura ficobilisomilor.

Ficobiliproteinele sînt cromoproteine hidrosolubile, intens fluorescente care la cianobacterii și algele roșii formează ~ 40—50 % din proteina celulară totală (Bryant și colab., 1979). În funcție de lungimea de undă a luminii pe care o absorb au fost grupate în 5 clase: *aloficocianina* (AF), *aloficocianina B* (AF-B), *ficocianina* (FC), *ficoeritrocianina* (FEC) și *ficoeritrina* (FE).

Ficobiliproteinele formează un lanț de transfer al energiei absorbite cu o eficiență de ~ 100 %, de la FC sau FEC la centrii de reacție din membrana tilacoidului, situați la sau lîngă situsul de atașare al ficobilisomului, via FC → AF → AF — B (Gantt și Lipschultz, 1973).

Spre deosebire de clorofile, pigmenții accesorii nu acționează direct în reacțiile de fotosinteză, ci transferă energia luminoasă pe care o captează la clorofile, asigurînd folosirea ei în procesele de fotofosforilare în același fel ca și energia fixată direct.

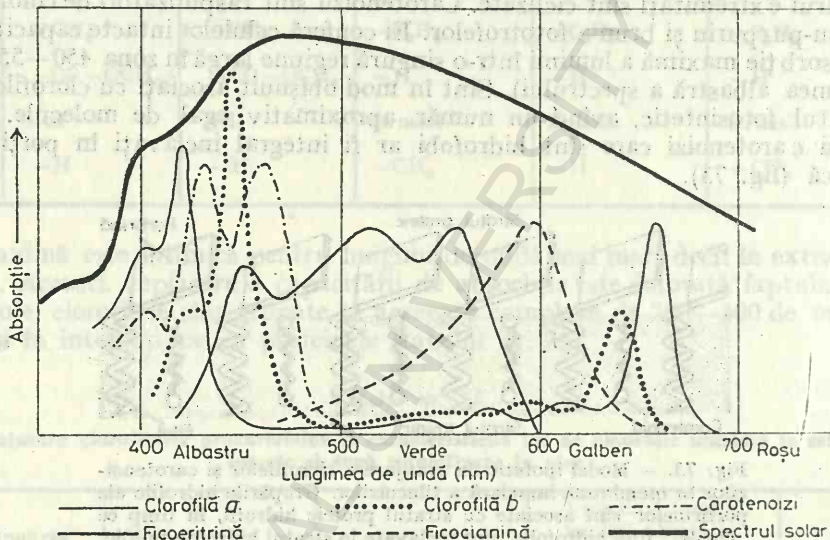


Fig. 74. — Spectrul de absorbție al diferiților pigmenți fotosintetici, evidențiind intensitatea cu care absorb lumina la diferite lungimi de undă. Împreună, ei absorb cea mai mare parte a luminii din spectrul solar (după Govindjee și Govindjee, 1974).

Semnificația biologică a pigmenților accesorii. Deși lumina solară este distribuită pe întregul spectru vizibil, clorofilele nu absorb decît într-o zonă limitată a acestuia, astfel că prezența pigmenților accesorii conferă microorganismelor o serie de avantaje, legate de faptul că măresc cantitatea de energie fotonică absorbită (fig. 74). Practic, nici un organism fototrof nu are un sistem de pigmenți capabil să absoarbă cu eficiență egală în întregul spectru de lumină solară. Combinația particulară a pigmenților prezenți într-un organism fototrof și interacțiunile lor cu proteinele determină spectrul de absorbție al acestuia și calitatea spectrală a luminii pe care o poate folosi pentru a face fotosinteză, astfel încît diferitele tipuri de organisme fotosintetizante utilizează, practic, toate lungimile de undă între 400 și 1100 nm. În plus, pigmenții carotenoizi exercită un rol fotoprotector, neutralizînd lumina care prin reacții de fotooxidare ar putea distruge clorofila și însuși aparatul fotosintetic (Brock, 1974).

Transformarea luminii în energie chimică implică „energizarea" sau excitația moleculelor de pigment, care apoi emit un electron excitat (e^{-*}).

Unitatea funcţională fundamentală a aparatului fotosintetic la nivelul căreia are loc acest proces este „*unitatea fotosintetică*". La alge (ca şi la plantele superioare), ea conţine ~ 300 de molecule de clorofile, număr considerat ca minim pentru a asigura transportul unui singur electron. „Unitatea" conţine ansamblul pigmenţilor care captează lumina („antena") şi un centru de reacţie în care energia transferată este „captată" şi utilizată pentru efectuarea unor reacţii chimice (fig. 75).

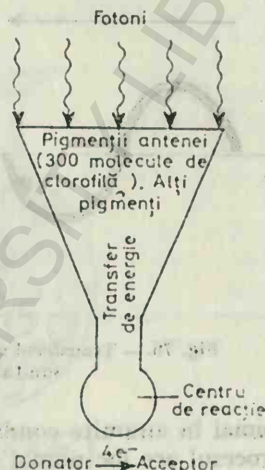


Fig. 75. — Schema unei unităţi fotosintetice (după Govindjee, 1974). Reprezentarea este ipotetică, deoarece poziţiile relative ale moleculelor pigmenţilor antenei şi centrului de reacţie nu sînt încă elucidate.

MECANISMELE MOLECULARE ALE FOTOSINTEZEI

Conversia fotosintetică a energiei luminoase în energie chimică este un proces extrem de complex, care se desfăşoară la microorganismele eucariote în cloroplaste, ca şi la plantele superioare, iar la procariote în sisteme membranare specifice.

ABSORBŢIA LUMINII

Energia radiantă luminoasă este transmisă în „pachete discrete" de energie, cunoscute sub numele de *cuante*. Cu cît lungimea de undă (λ) este mai mare, cu atît energia per cuantă este mai mică. Efectele posibile ale energiei absorbite de sistemele biologice sînt în funcţie de conţinutul în energie al cuantei respective şi, deci, în funcţie de lungimea de undă. Radiaţiile infraroşii cu $\lambda > 1\,200$ nm, au un conţinut energetic atît de mic, încît nu pot determina modificări chimice: energia lor absorbită este convertită imediat în căldură. Radiaţiile ionizante (X, γ, cosmice) au un conţinut energetic atît de mare, încît moleculele din calea lor devin imediat ionizate. Numai radiaţiile cuprinse între 200 şi 800 nm au un conţinut energetic care le permite să producă modificări chimice în molecula absorbantă şi corespund, deci, zonei din spectrul electromagnetic în care pot avea loc procese fotochimice.

Nivelele de energie. Înainte de absorbţia luminii, toate moleculele se găsesc în starea lor de energie minimală (stare normală la temperatura mediului) datorită distribuţiei geometrice a atomilor în spaţiu. Electronii se găsesc distribuiţi în spaţiu în jurul nucleului, în poziţii foarte exact definite, numite „orbital". Electronii situaţi pe orbitalul cel mai apropiat de nucleu au energia cea mai joasă în moleculă. Energia corespunzătoare orbitalelor creşte în raport cu mărimea razei lor. Cînd un atom sau o moleculă (spre exemplu, clorofila) absoarbe o cuantă, energia asociată cu ea este utilizată pentru a transfera un electron de pe orbitalul normal pe un orbital extern, de la un nivel energetic scăzut la un nivel energetic superior, respectiv de la starea sa fundamentală stabilă la o stare nestabilă, înalt energetică sau

„excitată" (fig. 76). Acesta este primul stadiu al procesului de transformare a energiei luminoase în energie chimică. În această fază însă, energia nu este utilizabilă, pentru că este integral conținută de moleculele de clorofilă „excitate". Tranziția electronului de la starea de bază la noua configurație are loc

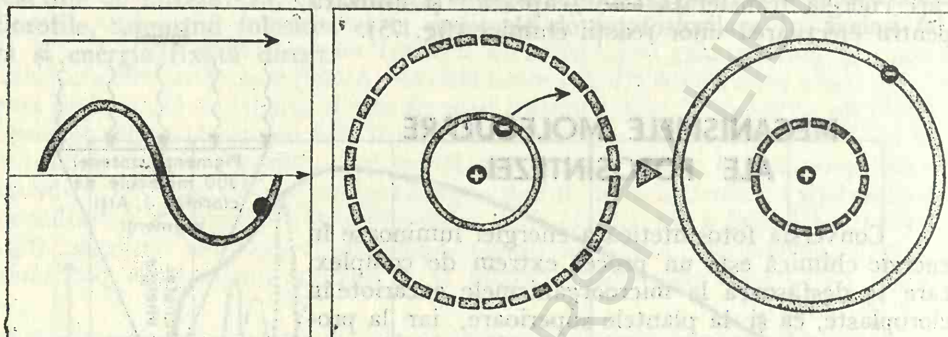


Fig. 76. — Transferul unui electron ca urmare a absorbției unui foton, de la starea fundamentală la o stare energetică „excitată".

numai în anumite condiții, stabilite de legile mecanicii cuantice. Mai precis, procesul are loc numai cînd fotonul are o energie care corespunde diferenței de energie dintre orbitalul inițial și cel extern pe care a fost deplasat. Spre exemplu, dacă energia moleculei în stare normală este E0 și aceea a moleculei excitate Ex, absorbția nu poate avea loc decît dacă $Ex - E0 = h\nu$, în care ν = frecvența luminii, iar h = constanta Planck ($h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ joule/s). Această condiție este absolut obligatorie, deoarece electronii pot ocupa numai stări energetice specifice distincte, și nu regiuni situate între aceste stări.

SOARTA ENERGIEI DE EXCITAȚIE. TRANSFERUL DE ENERGIE

În stare „excitată" molecula de pigment este foarte instabilă. Întoarcerea sa la starea inițială stabilă eliberează energie după procese competitive (disiparea sub formă de căldură, emisia de lumină fluorescentă, transferul energiei la o altă moleculă, care este, la rîndul său, excitată, deși nu a captat ea însăși un foton, sau conversia energiei de excitație în energie chimică), depinzînd, în special, de mediul în care se găsește.

În condiții experimentale, *in vitro*, spre exemplu, în cazul unei soluții de clorofilă excitată cu lumină, electronii deplasați revin rapid la starea inițială, emițînd o cuantă de energie sub formă de lumină fluorescentă.

In vivo, în celula intactă, această revenire, care ar însemna risipă de energie, nu are loc, datorită particularităților de structură și funcție ale tilacoizilor, care împiedică acest proces. Molecula de clorofilă „excitată" aproape instantaneu (10—15 secunde) după absorbția unui foton transferă cea mai mare parte din energia absorbită altor molecule ale aceluiași pigment și de la molecule ale unui pigment la moleculele altui pigment, care absoarbe energia

cu lungime de undă mai mare. Acelaşi fenomen se întîmplă şi cu energia absorbită de pigmenţii accesorii. Prin acest mecanism, energia absorbită este transferată de la o moleculă la alta şi canalizată spre *„centrii de reacţie"* (fig. 77), la nivelul cărora o moleculă specială de clorofilă „fotochimică" *(clorofila „capcană")* converteşte energia de excitaţie în energie chimică:

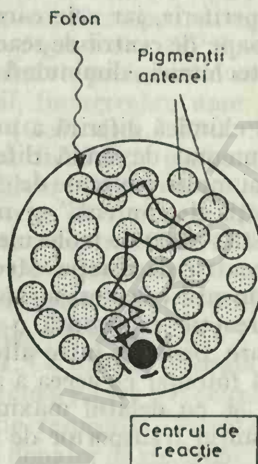


Fig. 77. — Transferul energiei de excitaţie de la o moleculă de pigment a antenei, excitată de un foton, la moleculele vecine şi din aproape în aproape la molecula de clorofilă „capcană" a centrului de reacţie care este oxidată (după Berkaloff şi colab., 1981). Reprezentarea este ipotetică, deoarece poziţiile relative ale moleculelor de pigmenţi şi centrului de reacţie nu sînt încă elucidate.

electronii „excitaţi" sînt transmişi unor molecule-acceptor, nepigmentare, şi introduşi într-un ciclu de reacţii de oxidoreducere. Durata totală a transferului este de cîteva zeci de picosecunde (1 ps = 10^{-12}s). Procesul este favorizat de faptul că cloroplastul dispune de un lanţ special de molecule, situate aproape de centrul de reacţie, care împiedică risipirea energiei stocate în electronii excitaţi. Aceste molecule, care formează *lanţul transportor de electroni*, asigură transferul electronilor de la centrul de reacţie şi utilizarea lor finală, pentru a converti $NADP^+$ (oxidat) la NADPH.

Mecanismul transferului de energie de la antena colectoare la centrii fotochimici nu este încă integral elucidat. El s-ar realiza prin mecanismul rezonanţei (Foster, 1948), bazat, în esenţă, pe faptul că o moleculă excitată intră într-o stare vibraţională sau de rezonanţă în acelaşi mod ca şi o moleculă învecinată. Dacă două molecule cu spectre de absorbţie asemănătoare sînt suficient de apropiate (~ 5 nm), energia de excitaţie poate „sări" de pe o moleculă pe alta. În acest proces se transferă cuanta de energie şi nu electronul excitat. Întrucît transferul de excitaţie se poate realiza cu o eficienţă de 100%, mecanismul rezonanţei poate asigura excitarea rapidă a unei serii întregi de molecule (fig. 77).

Numeroase adaptări structurale şi moleculare fac ca sistemul complicat al clorofilelor, pigmenţilor accesorii şi moleculelor centrilor de reacţie să funcţioneze ca un dispozitiv simplu, pentru a colecta cît mai multă energie şi a o canaliza spre lanţul transportor de electroni. Între acestea, un rol important au următoarele condiţii:

1) Moleculele de clorofilă nu sînt orientate aleator, în raport cu planul membranei, ci într-o stare favorabilă transferului, adică organizate ca un

edificiu compact și ordonat, asemănător unei rețele cristaline, determinată, în mare măsură, de formarea de complexe pigment—proteină.

2) Ele sînt separate de o distanță foarte mică (~ 1,5 nm), ceea ce asigură un transfer eficace de energie, prin rezonanță.

3) Aranjamentul moleculelor în antena colectoare, de asemenea, nu este întîmplător: moleculele care absorb lumina cu lungime de undă mai mică sînt situate la periferie, iar cele care absorb lungimi de undă mai mari sînt situate mai aproape de centrii de reacție, fapt care asigură transferul excitației spre centrii fotochimici, diminuînd corespunzător posibilitatea transferului în sens invers.

4) Natura chimică diferită a moleculelor de pigmenți asigură absorbția radiațiilor cu lungimi de undă diferite.

5) Cele mai multe molecule de clorofilă din unitatea fotosintetică de bază îndeplinesc funcția de „antenă" și nu iau parte la reacțiile fotochimice, în așa fel încît există ~ 300 de molecule cu rol de „antenă", pentru fiecare moleculă cu rol de centru de reacție. Mecanismul de concentrare a energiei luminoase de la pigmenții colectori ai antenei la moleculele speciale, fotochimice, din centrii de reacție reprezintă o adaptare foarte avantajoasă. Existența antenei colectoare permite, între altele, adaptarea frecvenței de absorbție la nivelul său (~ 1 foton/s) cu aceea a absorbției la nivelul moleculelor de clorofilă-fotochimică și cu debitul maxim al transferului de electroni, pe care îl poate asigura lanțul transportor de electroni (100 electroni/s).

REACȚIILE TRANSPORTULUI DE ELECTRONI

Transportul de electroni implică participarea a mai multe molecule-transportor, care formează un lanț, în sensul structural al termenului, adică o suită de molecule aflate în cantități echimoleculare, care ocupă o anumită poziție (în funcție de potențialul lor normal de oxidoreducere) într-o matrice cu constantă dielectrică joasă, bogată în galactolipide. Natura lor chimică este numai parțial cunoscută. Anumiți transportori sînt localizați pe fața externă a tilacoidelor spre stromă, iar alții spre spațiul intern. Fac excepție plastochinonele, molecule mobile, neasociate cu proteinele, extrem de lipofile și deci solubile în lipidele membranare, care par să fie accesibile pe ambele părți ale tilacoidului. Ele se găsesc în cantități de ~ 6 ori mai mari decît ceilalți transportori și realizează un fel de punte între cele două sisteme fotochimice.

Rezultatul net al fotosintezei oxigenice este transferul atomilor de H de la apă la CO_2. Ca și în alte cazuri, caracteristice sistemelor biologice, acesta se realizează prin procesul chimic de oxidoreducere, care face ca apa să fie oxidată (să piardă electroni), iar CO_2 să fie redus (să cîștige electroni), respectiv printr-un transfer de electroni, urmînd ca protonul (H^+) să fie preluat ulterior, din mediul apos, pentru a completa atomul de H. Datorită potențialului de oxidoreducere al apei ($E'_0 = +0,81$ v), net pozitiv față de cel al acceptorului cu compoziție încă necunoscută X ($E'_0 = -0,64$ v), acest transfer de electroni nu se poate face spontan. Ca urmare, în mod obișnuit, spontan, apa nu poate reduce CO_2 și nici nu poate fi oxidată de el. Diferența de gradient electrochimic de 1,2 v reprezintă un obstacol foarte mare, care, ca orice reacție foarte endergonică, nu poate fi depășit, fără un aport de energie.

În acest caz, teoretic, energia unei singure cuante nu este suficientă. Este neapărată nevoie de 2 cuante, respectiv de intervenţia a două reacţii de lumină, care acţionează în serie.

Acest proces este realizat la plante, ca şi la microorganismele care fac fotosinteză oxigenică, prin intrarea în funcţie a două fotosisteme, care fac ca transportul electronilor să se realizeze în două stadii principale, corespunzătoare celor două evenimente fotochimice. Descoperirea celor două *fotosisteme*, FS I şi FS II, numite şi *sisteme pigmentare* (SP I, respectiv SP II), a fost posibilă datorită faptului că ele absorb preferenţial radiaţii cu lungimi de undă uşor diferite, datorită, probabil, fie agregării unor molecule de pigment, fie complexării lor cu proteinele (Govindjee, 1974). Studiile efectuate în special la plantele superioare arată că distribuţia pigmenţilor în cele două sisteme de pigmenţi este diferită. Clorofila *a* este pigmentul cel mai abundent în ambele sisteme, dar într-un asortiment de forme diferite, sub raportul spectrului lor de absorbţie. Clorofila *b* este mai abundentă în FS II care conţine carotenoli, spre deosebire de FS I, în care predomină carotenii. Pigmenţii din centrii de reacţie ai celor două fotosisteme sînt, de asemenea, diferiţi, în funcţie de proprietăţile lor de absorbţie a luminii: Chl *a* I sau P 700 pentru FS I şi Chl *a* II sau P 680 pentru FS II. Ca urmare, energia luminoasă este captată în tilacoizi de două antene colectoare, care o cedează apoi, prin rezonanţă, clorofilelor din centrii de reacţie respectivi. Fiecare fotosistem este asociat cu o moleculă-acceptor şi cu una donator de electroni. Clorofila excitată din centrul de reacţie se oxidează, pierzînd un electron, care este transferat pe acceptorul nepigmentar şi îşi recapătă nivelul energetic iniţial, cînd primeşte un electron de la donatorul cu care este asociat fotosistemul respectiv. Fotosistemul I mediază — ca şi sistemul fototrofelor anoxigene — sinteza de ATP prin procesul de *fotofosforilare ciclică*, dar participă şi în *fotofosforilarea neciclică*. Fotosistemul II are ca funcţie specifică fotoliza (oxidarea) apei. Cei doi centri fotosintetici sînt interconectaţi funcţional prin lanţul transportor de electroni.

Dacă cele două fotosisteme sînt excitate simultan cu ajutorul radiaţiilor luminoase corespunzătoare se produce un flux neciclic de electroni, care leagă oxidarea apei de către FS II, cu reducerea $NADP^+$ la NADPH de către FS I, însoţite de producere de ATP. Această succesiune de reacţii care încorporează în serie cele două reacţii fotochimice — cunoscute sub denumirea de **fotofosforilare neciclică** s-ar desfăşura după modelul lui Hill şi Bendall („schema în Z", datorită asemănării reprezentării grafice cu această literă (fig. 78). Ele împart lanţul fotosintetic în trei segmente: 1) transportul electronilor de la apă la FS II; 2) transportul de la FS II la FS I; 3) transportul de la FS I la $NADP^+$ (fig. 79).

Transportul electronilor de la apă la FS II. Constituenţii primului segment al lanţului fotosintetic sînt răspunzători de degajarea unei molecule de O_2, prin oxidarea a două molecule de apă, în cursul a 4 etape fotochimice.

Prima reacţie fotochimică începe cu absorbţia unui foton de către antena FS II. Energia de excitaţie este transmisă clorofilei P 680 (Chl *a* II) din centrul de reacţie al unităţii fotosintetice, care excitată, la rîndul său, cedează un

electron, ce este transferat la acceptorul Q*), care este o plastochinonă. În felul acesta, potenţialul standard redox al Chl *a* II şi, implicit, nivelul energetic al electronului transferat cresc de la + 1,0 v la un potenţial vecin cu 0 (corespunzător acceptorului primar Q).

În urma acestui transfer clorofila P 680 este oxidată. Revenirea ei la starea normală este legată de recăpătarea electronului pierdut, de la donatorul Z, de natură necunoscută (probabil Chl *a*, asociată cu o proteină a cărei acti-

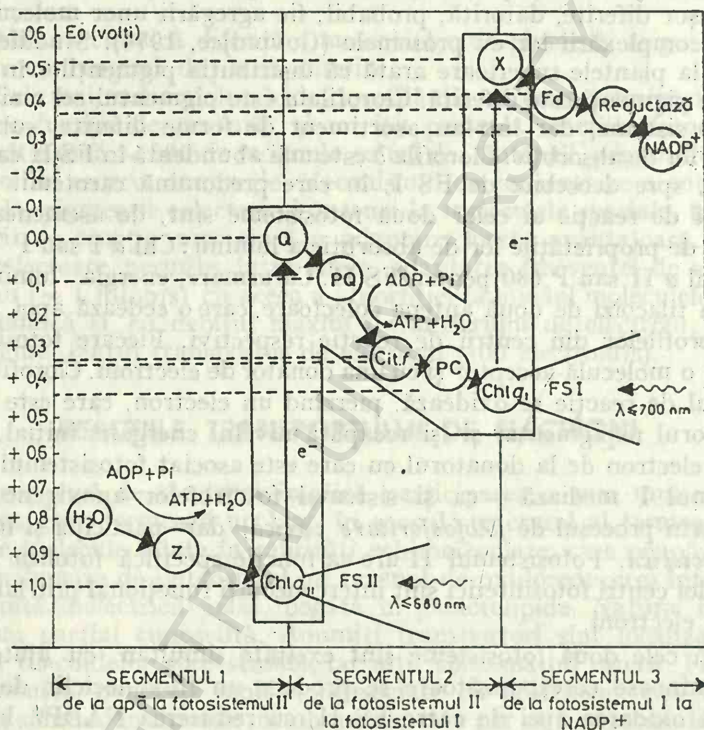


Fig. 78. — Reprezentare schematică a reacţiilor fotofosforilării neciclice (după Berkaloff, 1981). z — donatorul primar al SF II; PQ — plastochinonă; cit f— citocrom f; PC — plastocianină; Fd — ferredoxină; Reductaza-ferredoxin-NADP+ reductaza.

vitate necesită Mn^{2+} şi Cl^-). Donatorul Z al FS II ar trece prin patru nivele succesive de oxidare, fiecare însoţit de transferul unui electron, de la Z la clorofila „capcană" *a* II, care a fost oxidată de reacţia fotochimică. După ce a cedat 4 e^-, donatorul Z îi recapătă prin oxidarea a două molecule de apă Se eliberează o moleculă de O_2 şi 4 H, care trec în soluţie ca protoni (H^+), în spaţiul intratilacoidian.

*) Q — engl. *quencher* = stingător. Denumirea reflectă proprietatea clorofilei *a* II oxidată de a nu emite lumina fluorescentă. Acceptorul Q care a captat electronul clorofilei a „stins" acest pigment.

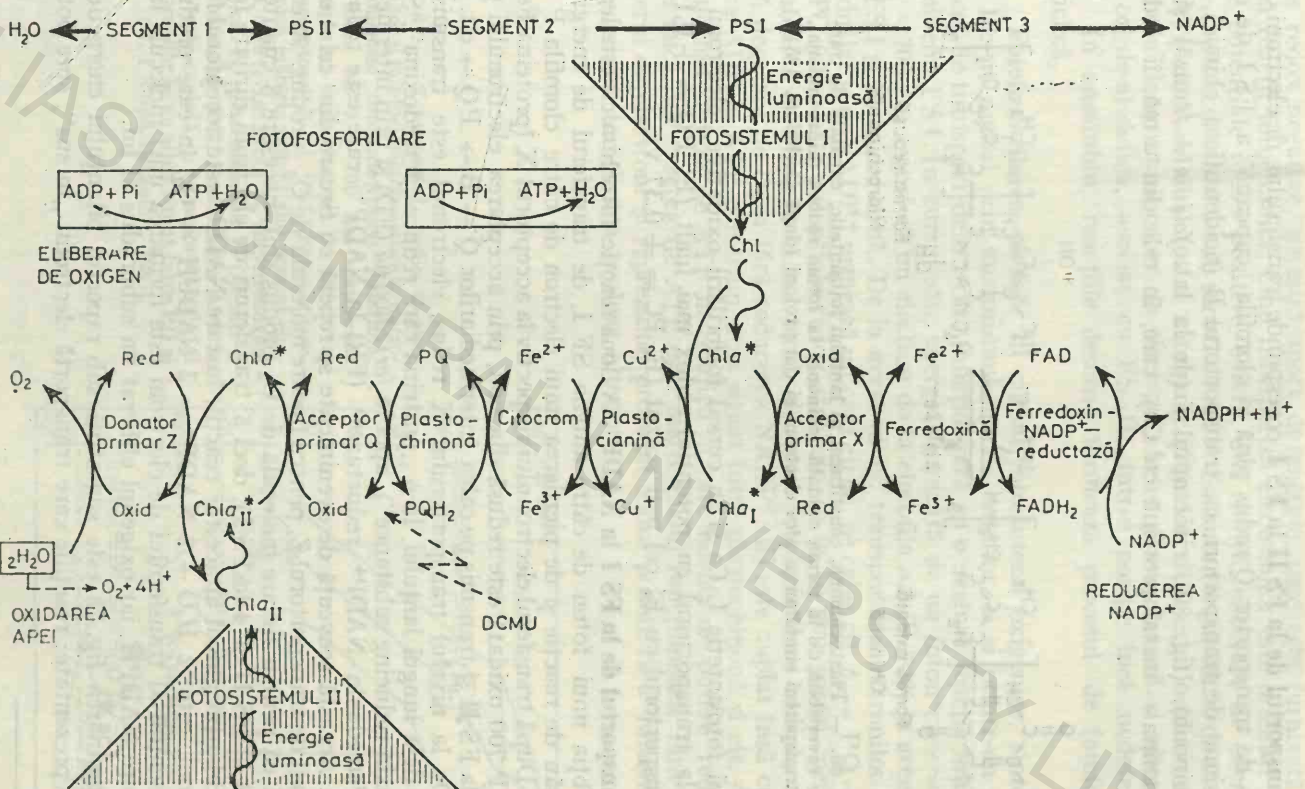


Fig. 79. — Reprezentare schematică a segmentelor lanțului fotosintetic (după Berkaloff, 1981). Săgeata întreruptă marchează situsul de acțiune al ierbicidului diclormetil uree (DCMU)

Transportul de la FS II la FS I corespunde transferului de electroni de la molecula de transportor Q redus pînă la clorofila „capcană" a FS I, de către o succesiune de transportori, ca transportorul B (neidentificat chimic), PQ (plastochinona), (fig. 80), citocromul *f* (de la lat. *folium* = frunză) și PC (plastocianina — metaloproteină cu Cu), care, în cele din urmă, îi cedează

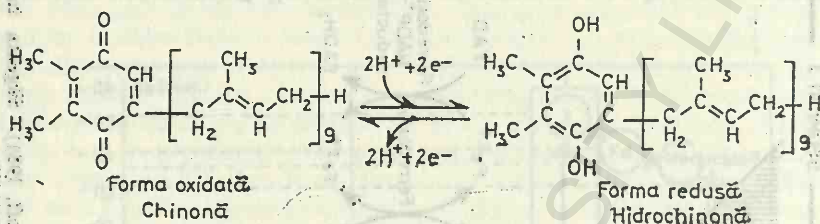


Fig. 80. — Plastochinona, constituent al lanțului fotosintetic, capabilă de tranziție reversibilă de la forma oxidată (chinona) la forma redusă (hidrochinona), cu transportul simultan a doi electroni și doi protoni (după Berkaloff, 1981).

sistemului fotosintetic I. Ca și în cursul fosforilării oxidative, electronii circulă de la transportorul cu potențial redox mai înalt (E_0' PQ = + 0,1 v) spre transportorul cu E_0' cel mai scăzut (E_0' PC = + 0,37 v).

Transportul de la FS I la NADP⁺. A doua reacție fotochimică este legată de absorbția unui foton de către antena SF I, de transferul de energie la centrul său de reacție și de pierderea unui electron de către clorofila P 700 excitată. După transferul electronului respectiv la acceptorul X (proteina Fe S), clorofila P 700 oxidată este redusă din nou, prin acceptarea electronului provenit de la FS II și transmis pe calea intermediarilor Q → B → PQ → cit. *f* → → PC. De la nivelul transportorului X redus, electronul este transmis la $NADP^+$, de-a lungul lanțului, la o „proteină care reduce „ferredoxina", SRF („ferredoxin reducing substance"), apoi la *ferredoxină* (FD) și prin intermediul enzimei ferredoxin -$NADP^+$ reductaza*) (FR) la $NADP^+$, care este redus la NADPH. Această secvență de evenimente se repetă cu fiecare din cei 4 electroni cedați de transportorul Z, pentru fiecare moleculă de O_2 produs. Aceasta înseamnă că pentru fiecare moleculă de O_2 produs sînt necesare 8 cuante de lumină (4 la FS II și 4 la FS I), deci 8 transferuri de electroni dirijate fotochimic. Bilanțul global al acestor reacții, în care $NADP^+$ este acceptorul final de electroni, este: $2\ H_2O + 2\ NADP^+ \rightarrow 2\ NADPH + O_2$, în care produsul primar esențial al transferului de electroni este formarea unei molecule înalt reducătoare NADPH, iar oxigenul eliberat un subprodus al lui.

Examinarea fig. 78 este sugestivă sub raportul bilanțului energetic al reacțiilor prezentate: reacțiile care transportă electronii „în sus", spre poten-

---

*) Ferredoxin-$NADP^+$ reductaza, o flavoproteină cu gruparea prostetică FAD, catalizează transferul de electroni și H^+ la $NADP^+$, care este redus la NADPH. Întrucît FR nu poate purta decît cîte un electron, reducerea are loc după reacția: $2\ Fd(Fe^{2+}) + 2\ H^+ + NADP^+ \rightarrow 2\ Fd\ (Fe^{3+}) + NADPH + H^+$.

ţiale redox negative, necesită aport de energie, care este furnizată de cele două reacţii fotochimice. Cînd transportul electronilor este orientat „în jos", spre potenţiale redox pozitive, există, din contră, eliberare de energie, care este captată şi stocată sub formă de ATP. Se sintetizează astfel două molecule de ATP de la ADP şi fosfat anorganic (P_i). Un situs este localizat în cadrul primului lanţ transportor de electroni, între plastochinonă şi citocromul *f*, iar cel de-al doilea, asociat cu FS II, într-o poziţie încă nedeterminată.

În ansamblu, reacţiile descrise formează procesul de fotofosforilare neciclică.

Fotofosforilarea ciclică. În cursul fotosintezei oxigenice, sinteza ATP are loc nu numai prin mecanismul descris anterior, ci şi printr-un al doilea proces de transport de e^-, care funcţionează cu o singură reacţie fotochimică, la nivelul FS I. În cursul său, energia furnizată de un foton cu $\lambda = 700$ nm sau <700 nm transferă un electron de la clorofila *a* I (P 700) la acceptorul X al FS I şi la ferredoxină. De la acest nivel, transportul electronilor în loc să fie dirijat spre $NADP^+$ urmează un curs ciclic, pe calea cit. $b_6 \rightarrow$ PQ $\rightarrow$ cit. *f* $\rightarrow$ $\rightarrow$ PC (ale căror potenţiale redox sînt din ce în ce mai joase), pentru a se reîntoarce la Chl *a* I. Acest ciclu, denumit fotofosforilare ciclică, evoluează fără degajare de O_2 şi fără reducerea $NADP^+$. El este cuplat însă cu fosforilarea ADP la ATP printr-un situs situat între plastochinonă şi cit. *f* (fig. 81), permiţînd sinteza de ATP în condiţii în care nevoia de putere reducătoare este mică, iar cererea de ATP este mare. Ciclul funcţionează fără donatori externi de electroni şi reprezintă, probabil, calea primitivă a fotosintezei, de la care cea neciclică a evoluat ulterior.

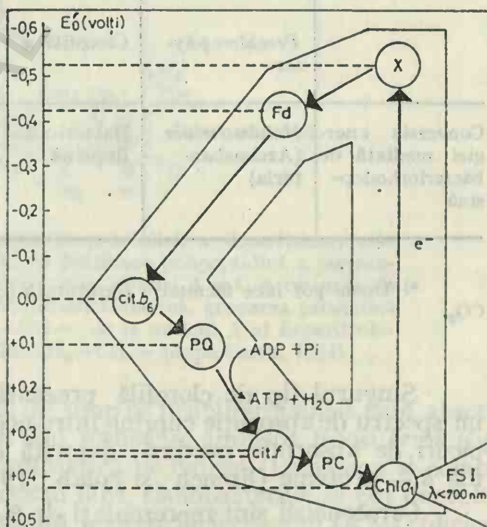


Fig. 81. — Transportul ciclic al electronilor şi fotofosforilarea ciclică la microorganismele fotosintetizante eucariote: un foton cu $\lambda \leq 700$ nm determină transportul unui electron de la chl a_1 la acceptorul X al FS I. Reacţia fotochimică măreşte potenţialul acestui electron, care revine la chl a_1 via ferredoxină (Fd), cit. b_6, plastochinonă (PQ), cit. f, plastocianină (PC). Fosforilarea ADP la ATP este cuplată cu transportul ciclic al electronilor la un situs situat între PQ şi cit. f (după Berkaloff, 1981).

Intervenţia celor două căi de fotofosforilare — ciclică şi neciclică — conferă o mare flexibilitate în echilibrarea nevoilor celulare de energie şi de putere reducătoare.

FOTOSINTEZA LA CIANOBACTERII

Cianobacteriile efectuează fotosinteză oxigenică, după un mecanism molecular foarte asemănător celui al plantelor superioare. Aparatul lor fotosintetic conține însă o serie de constituenți caracteristici (tabelele nr. 27 și 28). Clorofila și carotenoizii sînt localizați în tilacoizi, deși prezența lor și în membrana celulară nu poate fi exclusă (Stanier și Cohen-Bazire, 1977).

Tabelul nr. 27

Grupele majore de procariote fototrofe (după Stanier, Pfennig și Trüper, 1981)

Procesul metabolic	Grupul taxonomic	Pigmenții asociați cu conversia energiei fotonice	Produșii primari ai conversiei de energie	Sursele de carbon	Donatorii de electroni în fotosinteză
Fotosinteză anoxigenică	Bacterii purpurii	Bacterioclorofilă *a* sau *b*	ATP	organic și/sau CO_2	H_2, H_2S, S^0
Fotosinteză oxigenică	Bacterii verzi	Bacterioclorofilă *a*	ATP	CO_2	H_2, H_2S, S^0
	*Cyanobacteria**)	Clorofilă *a*	ATP +NADPH	CO_2	H_2O
	Prochlorophytes	Clorofilă *a*	ATP +NADPH	CO_2	H_2O
Conversia energiei mediată de bacteriorhodopsină	*Halobacterium* (Archaebacteria)	Bacteriorhodopsină	ATP	organic	—

*) Unele pot face facultativ fotosinteză anoxigenică, utilizînd H_2S ca reducător pentru CO_2.

Singurul tip de clorofilă prezentă la cianobacterii este clorofila *a* cu un spectru de absorbție cuprins între 660 și 705 nm, care prezintă o serie de 6 picuri de absorbție maximă, datorită diferitelor tipuri de complexe clorofilă *a* — proteine (French și colab., 1970), similare celor descrise la plante.

Carotenoizii sînt reprezentați de β-carotină însoțită de *zeaxantină* și/sau *echinonă*. Cromoproteinele localizate în ficobilisomi formează pigmenții majori ai antenei (Gray și Gantt, 1975). Ei sînt reprezentați, în ordinea abundenței lor relative, de ficocianină (λ max ~ 620 nm), aloficocianină (λ max ~ 650 nm), aloficocianină B (λ max ~ 670 nm) și, uneori, de ficoeritrină. Fiecare ficobiliproteină cu formula $(\alpha, \beta)_n$ este alcătuită din *n* subunități, cu struc-

Tabelul nr. 28

Biochimia comparată a aparatului fotosintetic la microorganisme (după Stanier și colab., 1981)

Grupul taxonomic	Pigmenții	Principalii purtători de electroni	Natura glicolipidelor membranare
Fotobacteriile purpurii	Bacterioclorofile, carotenoizi alifatici cu specificitate de grup și monociclici	Ferredoxine „bacteriene", chinone specifice de grup și citocromi	Lipsă
Fotobacteriile verzi			Monogalactozil-
Cianobacteriile și cloroplastele de la *Rhodophyta*	Clorofila *a*, ficobiliproteine	Ferredoxina „plantelor", plastochinonă, plastocianină, citocrom *f*	Monogalactozil-, digalactozil-, sulfochinovozil-
Prochlorophytes și cloroplaste de *Chlorophyta*	Clorofile *a* și *b*, β-carotină și derivații săi		

tura α, β, corespunzînd la două polipeptide diferite (α și β), avînd, fiecare, legată covalent o grupare cromoforă, *bilina* (fig. 82).

Transferul de energie de la antena colectoare la cei doi centri de reacție este într-o oarecare măsură compartimentat. Clorofila *a* absoarbe lumina cu lungimi de undă mai mari de 660 nm și o transmite exclusiv la fotosistemul I,

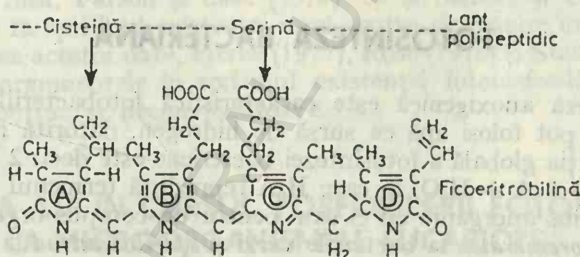


Fig. 82. — Ficoeritrobilina, gruparea prostetică a ficoeritrinei, este un lanț tetrapirolic deschis, legat de porțiunea polipeptidică a pigmentului prin legături covalente între nucleii pirolici A și C și resturile de cisteină și serină. În molecula de ficoeritrocianină, gruparea prostetică a ficocianinei, radicalul $CH_2=CH-$ de la nucleul A al ficoeritrobilinei este înlocuită cu radicalul CH_3-CH_2- (după Carra, 1981).

mediind numai fotofosforilarea ciclică, în timp ce ficobiliproteinele care absorb radiații cuprinse între 550 și 660 nm sînt transmise ambelor fotosisteme (fig. 83), fiind eficiente în producerea fotosintetică de oxigen (Lemasson și colab., 1973; Krogenann, 1973). Datorită acestui fapt, cianobacteriile se pot dezvolta chiar cînd activitatea FS II este distrusă selectiv cu ierbicidul DCMU (diclormetiluree), creșterea fiind asigurată prin fotosinteză anoxigenică de funcționarea FS I. Această comportare explică posibilitatea cianobacteriilor de a face facultativ fotosinteză anoxigenică, în prezența H_2S, care inhibă puternic activitatea FS II, blocînd astfel fotosinteza oxigenică. În aceste condiții se formează o enzimă de oxidare a H_2S, care permite cuplarea reducerii fotosin-

tetice a CO_2, cu oxidarea H_2S la S (Oren şi Padan, 1978), după reacţia: $2\ H_2S + CO_2 \rightarrow \langle CH_2O \rangle + 2\ S + H_2O$. Componenţii lanţului transportor de electroni la cianobacterii sînt similari celor de la plante, cu excepţia citocromului c_{553}, care înlocuieşte cit. *f*, caracteristic plantelor.

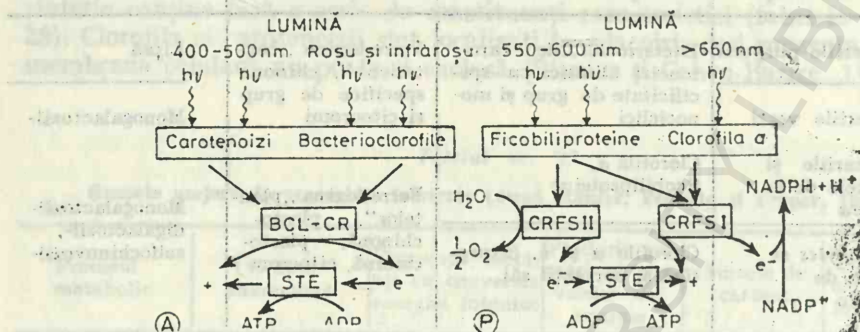


Fig. 83. — Reprezentarea schematică a modului de funcţionare a aparatului fotosintetic la fotobacteriile purpurii şi verzi (A) şi la cianobacterii (B) (după Stanier, 1979): Bcl — CR — bacterioclorofila centrului de reacţie; STE—sistemul transportor de electroni; CRFS I—centrul de reacţie al fotosistemului I; CRFS II — centrul de reacţie al fotosistemului II.

FOTOSINTEZA BACTERIANĂ

Fotosinteza anoxigenică este caracteristică fotobacteriilor purpurii şi verzi, care nu pot folosi apa ca sursă de hidrogen, datorită lipsei fotosistemului II. Ecuaţia globală a fotosintezei bacteriene este deci: $2\ H_2A + CO_2 \xrightarrow{h\nu} \langle CH_2O \rangle + 2\ A + H_2O$, în care H_2A reprezintă termenul general pentru un compus redus anorganic cu S sau pentru un compus organic. Pigmenţii carotenoizi (*izorenieraten* la bacteriile verzi şi *spiriloxantina* la cele purpurii) din complexul antenei absorb radiaţiile cu lungimea de undă de 400—500 nm, iar bacterioclorofilele pe cele din regiunea 700—1 000 nm (roşii şi infraroşii) pe care le canalizează spre centrul de reacţie (fig. 84). Acesta este cunoscut



Fig. 84. — Carotenoizii tipici pentru bacteriile sulfuroase verzi (A) şi purpurii (B) (după Gottschalk, 1979).

sub denumirea de P 870, în care 870 indică lungimea de undă la care apare extincţia maximă cînd centrul pierde un electron. Centrul de reacţie conţine *bacterioclorofilă, bacteriofitină* (bacterioclorofilă fără Mg), *proteine* şi un *carotenoid, ubichinona* (Gottschalk, 1979). Pentru fiecare cuantă de lumină absor-

bită, bacterioclorofila reactivă a centrului devine excitată și cedează un electron care este translocat la un lanț transportor de electroni, începînd cu un acceptor X neindentificat chimic, apoi, succesiv, la ubichinonă și un citocrom cu potențial redox înalt, cit. c_2. Procesul este cuplat cu fosforilarea ADP la ATP, în cursul transferului între ubichinonă și cit. c_2.

Întregul proces evoluează ca o fotofosforilare ciclică tipică, întrucît bacterioclorofila centrului de reacție oxidată inițial revine, în final, la starea normală, fiind redusă de un electron provenit de la cit. c_2. În fotosinteza anoxigenă, produsă de bacteriile purpurii și verzi, producerea de ATP reprezintă singura consecință chimică a absorbției luminii. În termeni de fotochimie, ea reprezintă un proces mai simplu decît fotosinteza oxigenică efectuată de plantele verzi și de unele categorii de microorganisme (Evans și Whatley, 1977).

Fotosinteza la *Chromatium*. Cusanovich și colab. (1968), precum și Hind și Olson (1968) au propus un model posibil de evoluție a fotofosforilării neciclice la bacteriile din genul *Chromatium*. Modelul implică intervenția a două reacții fotochimice, dintre care una este asociată cu fotofosforilarea ciclică, iar cea de-a doua numai cu producerea de compuși reducători, respectiv de ferredoxină redusă sau NADH, în loc de NADPH ca la plantele superioare. Cele două reacții efectuate de bacterioclorofile, la doi centri de reacție — P 870 și P 870′ (P 870 modificat), ar evolua complet separat și ar fi echivalente celor produse de fotosistemul I al plantelor.

Ulterior însă, Parson și Case (1970), ca și Seibert și De Vault (1970) au adus probe în sprijinul existenței unui centru de reacție unitar și la *Chromatium*. Pe baza acestor date, Pierce (1977), Rose (1978) și Stanier (1977, 1981) consideră că argumentele în sprijinul existenței fotofosforilării neciclice la bacterii sînt puține și neconvingătoare.

SINTEZA ATP ÎN CURSUL FOSFORILĂRII FOTOSINTETICE LA MICROORGANISMELE EUCARIOTE

Deși lanțul transportor de electroni al cloroplastului conține unele molecule-purtător similare celor descrise la bacterii și în mitocondrii, fotofosforilarea evoluează cu o serie de particularități, prezentate sintetic de Hinkle și Mc Carty (1978), precum și de Miller (1979), (fig. 85).

Ca și în lanțul respirator mitocondrial, constituenții lanțului fotosintetic au o orientare specifică în membranele tilacoidului: donatorii primari ai celor două fotosisteme (Z și PC) sînt situați spre fața luminală a membranei, în timp ce acceptorii primari (Q și X), ca și ferredoxina și ferredoxin reductaza sînt situați spre fața stromatică. Acest aranjament vectorial al transportorilor are drept urmare acumularea de protoni în interiorul tilacoidului, stabilind un gradient electrochimic și o diferență de potențial de $\sim$ 100 mV între fața luminală (încărcată pozitiv) și cea stromatică (încărcată negativ).

Fig. 86 ilustrează modul în care reacțiile la lumină desfășurate în membrana tilacoidului realizează forța protonmotrice necesară pentru sinteza ATP. Absorbția primului foton la nivelul antenei FS II este urmată de excitarea clorofilei speciale P 680, căreia îi modifică distribuția electronilor,

făcînd unul disponibil pentru transport. Procesul este repetat la absorbția fotonului următor. Cele două molecule de P 680, oxidate prin acest mecanism, sînt reduse de doi electroni proveniți din oxidarea apei cu ajutorul unei enzime, *Mn-proteina*. Oxigenul provenit de la apă este eliberat și difuzează din cloro-

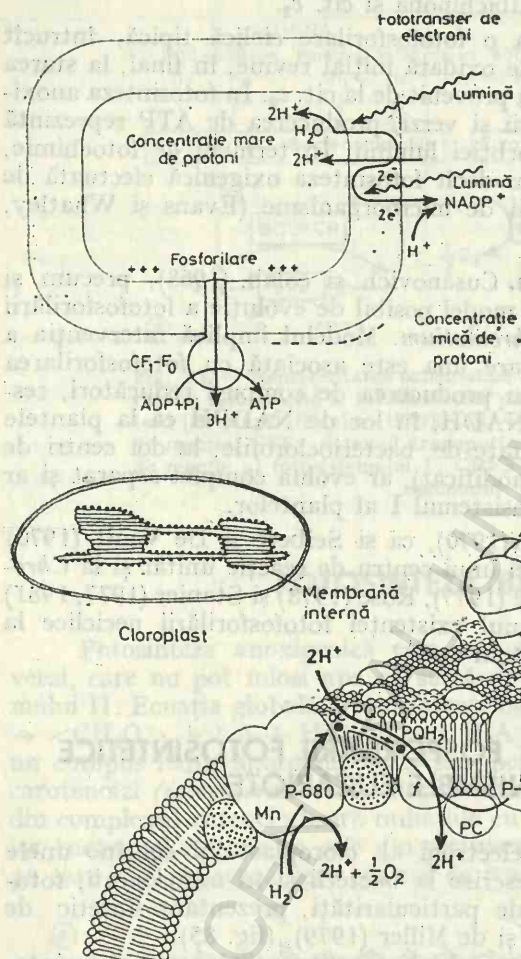


Fig. 85. — Reprezentarea schematică a translocației protonilor în cursul fosforilării fotosintetice în cloroplaste, evidențiind direcția inversă a drumului protonilor, în raport cu fosforilarea oxidativă. Fiecare pereche de electroni traversează membrana numai de două ori, translocînd doar 4 protoni. Pentru fiecare moleculă de ATP formată, trei protoni traversează complexul CF_1-F_0 (după Hinkle și Mc Carty, 1978).

Fig. 86. — Transportul electronilor și protonilor prin membrana cloroplastului în cursul fosforilării fotosintetice și al sintezei de ATP la microorganismele eucariote (după Hinkle și Mc Carty, 1978).

plast, iar cei 2 H^+ trec în soluție în interiorul membranei interne. Cei doi electroni de la P 680, deveniți disponibili pentru transfer, sînt preluați la nivelul suprafeței externe de plastochinonă (PQ), pe care, împreună cu 2 H^+ proveniți din mediul extern, o reduc la PQH_2. Aceasta se deplasează spre fața internă a membranei și eliberează cei 2 protoni în interiorul cloroplastului, transferînd 2 electroni la cit. *f* (foarte asemănător cit. *c*).

În continuare, electronii sînt transferați la plastocianină și, de la aceasta, la FS II (P 700). Cînd acesta este excitat de absorbția luminii, doi electroni

sînt din nou desprinşi şi transportaţi la suprafaţa membranei, pe acceptorul ferredoxină (proteina FeS). De la aceasta, electronii sînt transportaţi la FAD, care retrage doi protoni din mediul extern pentru a forma $FADH_2$. În cele din urmă, $FADH_2$ cedează doi electroni şi un proton la $NADP^+$ pentru a forma NADPH, la suprafaţa externă a membranei tilacoidului. După ce o pereche de electroni a străbătut întregul lanţ, trei protoni au trecut în afara membranei fotosintetice şi patru au apărut în interiorul ei. Prin acest proces, în interiorul membranei se acumulează protoni, proveniţi din disocierea apei, respectiv sarcini pozitive, care au devenit interne după ce au străbătut membrana de la exterior în cursul transferului de electroni (Hinkle şi Mc Carty, 1978; Miller, 1979).

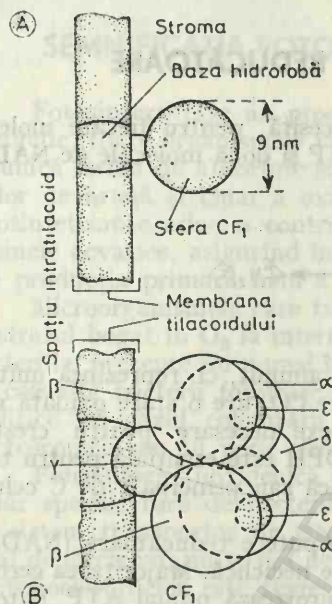


Fig. 87. — Model de structură al ATP-azei microorganismelor fototrofe eucariote. Porţiunea catalitică (sfera CF_1) este alcătuită din 5 tipuri de subunităţi, dintre care unele sînt în dublu exemplar, după schema α_2 β_2 $\gamma\delta\varepsilon_2$. Baza hidrofobă este integrată în membrana tilacoidului (după Baird şi Hammes, 1976).

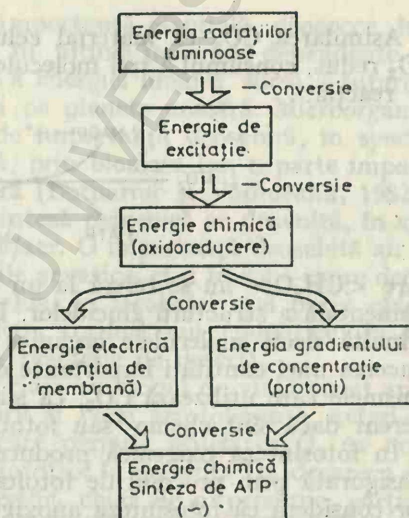


Fig. 88. — Conversiile de energie în cursul fosforilării fotosintetice.

Din cele prezentate rezultă următoarele deosebiri esenţiale între fotofosforilare şi fosforilarea oxidativă:

— direcţia de transport şi de acumulare a protonilor are o orientare inversă. Sub acţiunea energiei luminoase reacţiile de transfer ale electronilor „pompează" protonii înspre interiorul membranei, făcîndu-l mai acid decît exteriorul;

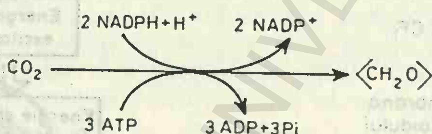
— fosforilarea la nivelul ATPazei este dirijată, de asemenea, de un flux invers de protoni, îndreptat de la interior spre exterior;

— raportul dintre moleculele reactante și ioni este diferit față de cel din mitocondrii: fiecare pereche de electroni traversează membrana tilacoidului numai de două ori, translocînd numai patru protoni. Pentru fiecare moleculă de ATP formată este necesar ca trei protoni să străbată complexul ATPazei (CF1—F0), (fig. 87) de la interior spre exteriorul membranei fotosintetice (Hinkle și Mc Carty, 1978; Miller, 1979).

În felul acesta, sinteza de ATP prin procesele de fotofosforilare reprezintă rezultatul unei serii de patru conversii succesive ale energiei radiațiilor luminoase pînă la formarea legăturilor macroergice (~) (fig. 88).

PRODUCEREA DE PUTERE REDUCĂTOARE

Asimilarea CO_2 ca material celular necesită, pentru fiecare moleculă de CO_2 redus, consumul a trei molecule de ATP și două molecule de NADPH după reacția:



în care $<CH_2O>$ nu se referă la un produs anumit, ci reprezintă unitatea fundamentală a structurii glucidelor. Deoarece CO_2 are o stare oxidată mult mai înaltă decît moleculele organice complexe necesare pentru creștere, producerea unei cantități importante de NADPH este esențială pentru toate organismele care utilizează CO_2, ca sursă unică sau principală de C celular, indiferent dacă sînt chemo- sau fototrofe.

În fotosinteza oxigenică producerea de putere reducătoare (NADPH) este asigurată prin procesul de fotofosforilare neciclică. Majoritatea cercetătorilor consideră că fotosinteza anoxigenică furnizează numai ATP, datorită faptului că bacteriile respective nu au echipamentul necesar și, în primul rînd, nu au fotosistemul I (implicat în fotofosforilarea neciclică), nu pot efectua reacția a doua la lumină și, ca urmare, nici nu pot utiliza apa ca donator de hidrogen. De aceea, asimilarea CO_2 de către bacteriile purpurii și verzi este dependentă de producerea de NADPH pe alte căi, nefotochimice, în special, prin oxidarea H_2S, a altor compuși reduși ai S și a H_2, astfel încît fotofosforilarea neciclică nu mai este necesară. Unele bacterii purpurii sau verzi pot obține C celular de la o gamă largă de compuși organici simpli ca zaharurile, acizii organici, alcoolii, aminoacizii etc. În aceste cazuri, cînd un compus organic înlocuiește CO_2, biosinteza $<CH_2O>$ este dependentă numai de aportul de ATP și nevoia de donatori anorganici de electroni dispare (Stanier, 1977).

Producerea de NADPH de la H_2S. Potențialul redox al donatorilor de H utilizați de fotobacterii este mult mai negativ decît al apei și relativ apropiat de cel al NAD^+. Valorile E_0' pentru oxidarea H_2S la sulf, a S^0 la sulfit și a sulfitului la sulfat sînt, după Gottschalk (1979), de $-0,25$, $+0,05$ și

respectiv —0,28 v. În consecință, cuplarea oxidării H_2S cu producerea de NADPH nu necesită un consum mare de energie și acesta se poate realiza printr-un mecanism descris și la chimiotrofe, și anume *transferul invers de electroni, dirijat de ATP*. În acest proces, lumina participă numai indirect, furnizînd ATP produs prin fotofosforilarea ciclică.

Producerea de NADPH de la H_2. Unele fotobacterii ca *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas capsulata* etc. pot utiliza hidrogenul molecular ca donator de H, într-un proces dependent indirect de lumină. Procesul implică reducerea unui citocrom cu potențial înalt, urmată de „pomparea" electronilor la NAD^+, pe calea citocromului *b* și a ubichinonei, cu consumul a 2 ATP.

SEMNIFICAȚIA FOTOSINTEZEI MICROORGANISMELOR

Fotosinteza este un proces cu importanță esențială, deoarece, în sens energetic, toate organismele vii sînt, în ultimă instanță, dependente de ea, ca unică formă de absorbție și fixare a energiei luminii, sursă a tuturor formelor de hrană și chiar a oxigenului pe planeta noastră. Microorganismele fotosintetizante aduc o contribuție de importanță deosebită, în special, în bazinele acvatice, asigurînd în natură, prin biomasa lor, o parte importantă din producția primară netă a acestora (Botnariuc și Vădineanu, 1982).

Microorganismele care fac fotosinteză oxigenică se dezvoltă, în special, în stratul bogat în O_2 la interfața apă/aer. O importanță deosebită au cianobacteriile, prezente nu numai în mediile acvatice, ci și în sol — spre deosebire de celelalte bacterii fototrofe — sau chiar în localizări mai puțin obișnuite, epifitice (în cazul colonizării suprafeței rocilor) sau endolitice (în fisurile microscopice sau în porii stîncilor în regiunile de deșert).

Fotosinteza anoxigenică este asociată cu modul de viață strict anaerob. Chiar speciile rare de bacterii purpurii și verzi aerotolerante, avînd uneori un sistem transportor de electroni care permite utilizarea O_2 ca acceptor final de electroni, nu se pot dezvolta fototrof în prezența O_2, deoarece sinteza bacterioclorofilelor este represată specific, chiar de o presiune parțial scăzută de oxigen. Proprietățile fiziologice le limitează, deci, la habitaturi acvatice fără O_2, care conțin nutrienți specifici, necesari acestui proces (H_2S, H_2, compuși organici simpli), rezultați din activitatea bacteriilor chemotrofe anaerobe, localizate în sedimentul subiacent. Foarte frecvent sînt întîlnite în lacuri mîloase, poluate organic, sub un strat mai mult sau mai puțin dens de cianobacterii, alge sau chiar plante, care ecranează lumina, oprind radiațiile cu anumite lungimi de undă din lumina solară.

Clorofilele bacteriene absorb radiații a căror lungime de undă este apropiată de aceea a radiațiilor infraroșii și, în consecință, bacteriile pot face fotosinteză în condiții de luminozitate foarte scăzută, aproape de obscuritate, corespunzînd unei zone a spectrului neperceptibilă de ochiul omenesc. Astfel, banda principală de absorbție a bacterioclorofilei *b* ($\sim$ 1 030 nm) este situată foarte aproape de limita dincolo de care energia cuantică devine insuficientă pentru a determina reacții fotochimice (Stanier, 1981). În mod similar, unele *Chlorobiaceae* pot să crească în ape adînci sub 20 m datorită prezenței unor carotenoizi speciali, care absorb numai radiații cu $\lambda = \sim 460$ nm (în regiunea violet a spectrului). În felul acesta, bacteriile pot trăi în ape la adîncimi mai

mari, unde primesc radiaţiile care au trecut prin filtrul biologic reprezentat de algele situate la suprafaţă.

Capacitatea bacteriilor de a utiliza radiaţiile infraroşii asigură obţinerea unui supliment din energia solară pe suprafaţa globului. După cum au arătat Stanier şi Cohen-Bazire (1981), din suprapunerea spectrelor de absorbţie ale diferitelor organisme fotosintetizante rezultă că, practic, toate regiunile spectrului de lumină solară sînt folosite în fotosinteză. Această particularitate are ca substrat, printre altele, o relaţie de complementaritate între fotosinteza bacteriană şi aceea a algelor din mediul acvatic: algele fac fotosinteză în aerobioză, la suprafaţa apelor, absorbind radiaţiile din regiunile albastre şi roşii, lăsîndu-le să treacă în profunzime pe cele din regiunile roşu îndepărtat şi infraroşu, care sînt preluate de bacteriile fototrofe, în procesele lor de fotosinteză anaerobă, din zonele mai adînci ale apei şi de la suprafaţa mîlului (fig. 89).

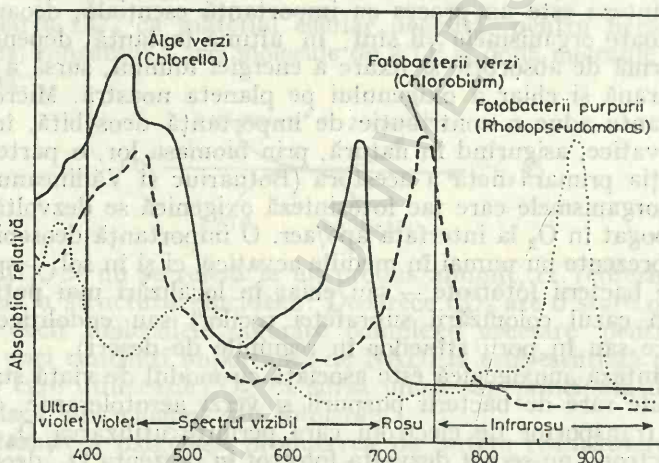


Fig. 89. — Spectrele de absorbţie ale luminii de către o algă verde *(Chlorella)*, comparativ cu fotobacteriile purpurii *(Rhodopseudomonas)* şi verzi *(Chlorobium)*; în regiunile roşu şi infraroşu benzile de absorbţie ale celor trei microorganisme sînt complementare (după Stanier, 1970).

În lacurile oligotrofe, zona anaerobă este situată la 10—30 m, deoarece însăşi coloana de apă devine un filtru important şi nu transmite practic decît radiaţiile din regiunea albastru-verde a spectrului solar. În acest caz, rolul de „pigment de recoltă" revine carotenoizilor. Cele mai multe bacterii fototrofe au vacuole cu gaze, cu ajutorul cărora îşi reglează poziţia pe verticală în bazinele acvatice.

Semnificaţia evolutivă a metabolismului fototrof. Fotobacteriile purpurii şi verzi reprezintă, probabil, organisme foarte vechi, derivate din celulele fototrofe apărute anterior emergenţei fotosintezei oxigenice. Ele au fost, o perioadă de timp, singurele forme capabile să folosească energia radiantă a pămîntului primitiv lipsit de O_2.

Apariția capacității de a utiliza apa ca donator de electroni în fotosinteză a implicat complicarea aparatului fotosintetic, prin adăugarea celui de-al doilea tip de centru de reacție fotochi ică. Aceasta a reprezentat un moment important în evoluția biologică, prin acumularea masivă de O_2 în atmosfera terestră și decurgînd din aceasta posibilitatea apariției metabolismului respirator aerob, care a devenit ulterior mecanismul biologic cel mai răspîndit de producere a energiei în natură.

Factorul cel mai important care a permis supraviețuirea fotobacteriilor primitive pînă în prezent a fost probabil prezența (sau evoluția) unor sisteme de pigmenți cu spectre de absorbție foarte diferite de cele ale organismelor fototrofe oxigenice. S-a evitat, astfel, competiția directă pentru energia radiantă solară, fotobacteriile rămînînd cantonate în straturile acvatice profunde anoxibiotice, în timp ce organismele cu fotosinteză de tip oxigenic s-au dezvoltat în straturile de suprafață și pe sol, în contact direct cu atmosfera al cărei conținut în O_2 a continuat să crească (Stanier, 1976).

CONVERSIA ENERGIEI LUMINOASE LA HALOBACTERIA

Halobacteriile sînt microorganisme adaptate să trăiască în lacuri și mări hipersaline (spre exemplu, în Marea Moartă, care în condiții de iradiere solară intensă conține ~ 340 g săruri la litru, sub formă de NaCl și $MgCl_2$, Nissenbaum, 1975). Ele se dezvoltă cel mai bine în medii cu NaCl 4,3 molar (~ 250 g/l). La concentrații sub 3,0 molar încetează să se dezvolte, iar sub 2,0 molar învelișul lor celular se dezintegrează. Datorită prezenței unor mecanisme speciale de apărare, halobacteriile au o concentrație intracelulară de săruri echivalentă cu cea externă (3—4 molar KCl și 0,5—1 molar NaCl), dar realizată cu săruri diferite, deoarece, ca și celelalte celule vii, ele concentrează K^+ și elimină Na^+, deși mediul este foarte bogat în Na (Bayley și Morton, 1978; Werber, 1980).

Halobacteriile au o serie de proprietăți caracteristice care le premit să trăiască în condițiile mediilor hipersaline:

1) Proteinele lor conțin foarte multe grupări acide și necesită concentrații mari de săruri pentru a-și menține starea nativă.

2) Membranele lor conțin un pigment carotenoid unic — bacteriorubrina— care le protejează de efectul nociv al radiațiilor solare și colorează în roșu soluțiile saline concentrate, în care se dezvoltă halobacteriile.

3) Compoziția lipidelor polare este foarte deosebită.

4) Învelișul celular este format dintr-o membrană tipică („unit membrane"), strîns acoperită de o matrice structurală, care menține forma celulei. Ea este alcătuită din glicoproteine foarte asemănătoare celor din celulele eucariote (Mescher și Strominger, 1978) sau dintr-un strat proteic gros de 5—15 nm, avînd pe suprafață o grupare caracteristică a subunităților constitutive, după un model hexagonal, cu o periodicitate de 14 nm. Nu au perete celular de tip bacterian, deoarece nu este necesar pentru protecția de șocul osmotic, concentrația internă și externă a sărurilor fiind aceeași. La *Halococcus morrhuae*, stabilitatea osmotică este asigurată de un perete celular gros, glucidic, format din glucoză, manoză, galactoză, acizi glucuronic și galacturonic, N-glicil-glucozamină, galactozamină, acid glucozaminuronic, acetat și sulfat, în care glicina are rolul de a conecta lanțurile glican prin legături peptidice între glucozamină și acizii uronici (Steber și Schleifer, 1979).

5) Rezistența lor la săruri este controlată de o plasmidă care acționează la nivelul transcrierii genetice a ADN la ARNm și asupra subunității ribosomale 50 S. Datorită acestui fapt, în anumite condiții, halobacteriile își păstrează viabilitatea cîțiva ani, chiar pe cristale de sare. La concentrații mai

mici de 10 % NaCl bacteriile se lizează, mai degrabă ca urmare a dizolvării peretelui celular decît din cauza unei ruperi prin efecte osmotice.

6) Halobacteriile sînt organisme aerobe obligate și chemoorganotrofe. Utilizează proteinele și aminoacizii preferențial, în raport cu glucidele. În Marea Moartă și în Marele Lac Sărat sînt localizate predominant (7.10^7 celule/ml) pe lîngă unele alge și protozoare.

7) Ele conțin, pe lîngă ADN cromosomal major (avînd un conținut de baze G + C = 57—60 %), o moleculă de ADN satelit minor (reprezentînd 11—36 % din ADN total, G + C = 57—60 %) a cărei semnificație biochimică este neclară (Moore și McCarty, 1969).

Unele bacterii halofile (de exemplu, *Halobacterium halobium*) au în membrana plasmatică, localizat în anumite zone care formează „membrana purpurie", un pigment caracteristic — *bacteriorhodopsina*. Aceasta formează un sistem foarte simplu care permite celulei să capteze energia luminoasă și să o înmagazineze sub formă de ATP, pentru a satisface nevoile energetice ale activității celulare (Oesterhelt și Stoeckenius, 1973).

STRUCTURA ȘI FUNCȚIA MEMBRANEI PURPURII

Membrana purpurie corespunde unor zone delimitate („pete" sau „petice") din structura membranei celulare la *H. halobium*, situate la același nivel cu restul suprafeței membranei, numită *membrana roșie*, datorită conținutului său ridicat în carotenoizi. Culoarea purpurie este datorată unui complex proteină—retinal numită *bacteriorhodopsină* (Oesterhelt și Stoeckenius, 1973).

Rhodopsinele sînt cromoproteine formate dintr-o moleculă de *retinal*, un derivat aldehidic al vitaminei A, fixat de un rest de lizină al unei proteine caracteristice — *opsina* — prin intermediul unei baze Schiff (fig. 90). Complexul retinal—proteină formează cromoforul pigmenților vizuali, situați în retina animalelor superioare și este caracterizat prin spectrul său de absorbție maximă, variabil la diferitele specii animale, dar caracteristic proteinelor de care este legat retinalul.

Membrana purpurie conține un singur tip de proteină, cu masa moleculară ~ 26 000 dal (reprezentînd 75 % din greutatea sa uscată), și lipide (25 %), ceea ce revine la ~ 10 molecule de lipide/moleculă de bacteriorhodopsină. Ca și în cazul pigmenților vizuali, bacteriorhodopsina conține un grup retinal per moleculă de proteină. Culoarea membranei provine din interacțiunile necovalente ale proteinei cu retinalul.

Bacteriorhodopsina prezintă două picuri de absorbție maximă a energiei luminoase, și anume, o bandă îngustă la ~ 280 nm (în regiunea ultraviolet) și o bandă largă la ~ 560—575 nm (în regiunea galbenă-verde a spectrului).

Similaritatea de structură a bacteriorhodopsinei cu pigmenții vizuali a sugerat de la început că funcția ei este corelată cu proprietatea de absorbție a luminii. Datorită grupării caracteristice a moleculelor componente, membrana purpurie are o structură cvasicristalină, ale cărei detalii au fost studiate de Blaurock (1969), cu ajutorul difracției în raze X, și de Oesterhelt și Stoeckenius (1974), cu ajutorul diferitelor tehnici de microscopie electronică. Henderson și Unwin (1975), completînd aceste rezultate, au elaborat modelul de structură tridimensională a membranei purpurii, care are la bază o rețea

hexagonală în planul membranei. Unitatea de construcţie, respectiv cea mai mică unitate care se repetă, constă din trei molecule de proteină şi 40 de molecule lipidice. Proteina are o mare porţiune formată din aminoacizi hidrofobi, ceea ce este în acord cu datele furnizate de difracţia cu raze X, care arată că o mare parte din fiecare moleculă de proteină este inclavată în interiorul zonei hidrofobe a membranei.

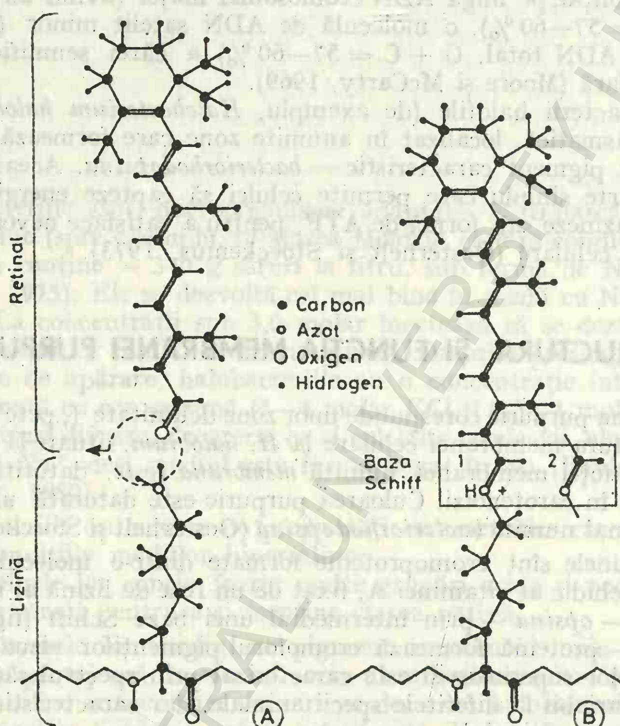


Fig. 90. — Structura chimică a retinalului, gruparea cromoforă a bacteriorhodopsinei, răspunzătoare de absorbţia luminii. El este legat de proteină prin intermediul lizinei. Legătura se face prin eliminarea unei molecule de apă rezultată dintr-un atom de oxigen de la aldehida terminală a retinalului şi doi atomi de hidrogen de la gruparea amino a lizinei, cu formarea unei baze Schiff între atomii de C şi N. În cursul fotoreacţiei, baza Schiff pierde şi recîştigă un proton, alternînd între două forme: protonată (1) şi deprotonată (2) (după Oesterhelt, 1976).

FORMAREA BACTERIORHODOPSINEI ŞI A MEMBRANEI PURPURII

În condiţii de aprovizionare limitată cu oxigen, halobacteriile sintetizează *bacterioopsină*, care este inserată în membrana celulară unde se combină cu retinalul pentru a forma *bacteriorhodopsină*.

În condiţii de sinteză continuă, bacteriorhodopsina se depune ca o reţea cristalină hexagonală, formînd „petice" mari de „membrană purpurie", care pot fi evidenţiate în membrana celulară la microscopul electronic, pe

celule îngheţate şi fracturate (Blaurock şi Stoeckenius, 1971). În unele cazuri, membrana purpurie poate reprezenta mai mult de jumătate din membrana celulară bacteriană.

Funcţia bacteriorhodopsinei. La organismele animale, rhodopsinele şi celulele retinei înregistrează impactul fotonilor şi îl traduc într-un semnal electric, care este transmis pe cale nervoasă pînă la creier. La bacteriile halofile, lumina induce modificări de conformaţie ale bacteriorhodopsinei şi, ca urmare, fragmentele de membrană purpurie iluminate se decolorează. În aceste condiţii, absorbţia maximă la 570 nm (corespunzînd formei purpurii a membranei) diminuă şi creşte corespunzător absorbţia la 415 nm (corespunzînd formei decolorate). Forma purpurie se regenerează spontan la întuneric ceea ce demonstrează că atunci cînd absorb o cuantă de lumină, moleculele de bacteriorhodopsină oscilează rapid între cele două forme (purpurie şi necolorată) (fig. 91).

Tranziţia retinalului de la forma *cis* la forma *trans* sub influenţa impactului luminii joacă un rol important în biochimia vederii. Este probabil că un fenomen asemănător se produce şi la halobacterii prin decolorarea membranei purpurii sub acţiunea luminii şi prin recolorarea ei la întuneric (fig. 92).

Studiile de ultrastructură, structură moleculară şi metabolism demonstrează că celulele de *H. halobium* au două posibilităţi de a sintetiza ATP:

a) În condiţii de mediu normale, cînd celula găseşte oxigen şi substanţele nutritive necesare, bacteriile sînt lipsite de membrană purpurie şi desfăşoară un metabolism de tipul respiraţiei aerobe. Ca şi alte bacterii aerobe, *Halobacterium* foloseşte oxigenul pentru a crea un gradient electrochimic de protoni prin membrana sa celulară.

b) În condiţii limită (anaerobioză totală sau parţială, asociată cu lipsă de nutrienţi), bacteriile sintetizează membrana purpurie şi cu ajutorul bacteriorhodopsinei, creează un gradient electrochimic de protoni şi convertesc direct energia luminoasă în ATP. Bacteriorhodopsina acţionează ca o pompă de protoni dirijată de lumină. Datorită acestui mecanism, în condiţii anaerobe. celulele iluminate care conţin bacteriorhodopsină continuă să-şi desfăşoare funcţiile bioenergetice ca: fosforilarea (adică producerea de ATP), înglobarea K^+ şi transportul aninoacizilor prin membrană şi chiar furnizează energie pentru mişcarea flagelilor (Hubbari şi colab., 1976), (fig. 93).

Metabolismul energetic la *Halobacterium* este deci legat de transportul protonilor prin două mecanisme diferite, după cum transportul protonilor din celulă este stimulat de lumină sau de O_2. Cele două mecanisme sînt posibile pentru că membrana celulară la *Halobacterium* conţine în structura sa, pe de o parte, „petice" de membrană purpurie, iar, pe de alta, zone în care sînt localizaţi pigmenţii lanţului respirator. Procesul dirijat de lumină este mediat de membrana purpurie şi de bacteriorhodopsină, iar cel dirijat de O_2 este mediat de lanţurile respiratorii, în prezenţa unui substrat oxidabil (Oesterhelt şi colab., 1978). Potenţialul de membrană (pozitiv pe suprafaţa externă a celulei) şi concentraţia protonilor mai mare la exterior rezultate prin aceste mecanisme determină o scurgere în sens invers a protonilor prin ATP-ază, care sintetizează ATP de la ADP şi fosfat anorganic. ATP-aza are o acţiune reversibilă: determină ieşirea protonilor din celulă în momentul în care hidrolizează ATP. În acest fel, celula transformă energia gradientului de protoni în ATP şi acumulează energie în gradienţi de ioni de Na^+ şi K^+. Aceasta are

ca rezultat acumularea unor concentrații intracelulare de ~ 4 moli K^+, care pot echilibra osmotic concentrația mare de Na^+ de la exterior (Stoeckenius și colab., 1979; Werber, 1980).

Fig. 91. — Fotoreacția ciclică determină tranziția de la bacteriorhodopsină colorată la forma decolorată, cu o serie de intermediari încă nedescoperiți. Decolorarea este rezultatul unei modificări în structura chimică a proteinei. În cursul decolorării este eliminat un proton (H) de la proteină care este recâștigat cu revenirea la forma colorată (după Oesterhelt, 1976).

Fig. 92. — Izomerizarea retinalului (tranziția cis⇄trans) sub acțiunea luminii (cu rol primordial în biochimia vederii la animale) explică decolorarea membranelor purpurii la *Halobacterium*, sub acțiunea luminii și colorarea lor la întuneric (după Meilhards, 1974).

Fig. 93. — Funcțiile bioenergetice ale halobacteriilor (după Oesterhelt și colab., 1979).

MECANISMELE MOLECULARE ALE FOSFORILĂRII LA HALOBACTERIUM

Bacteriile halofile de tipul *Halobacterium* folosesc energia luminoasă pentru a dirija un proces de fosforilare (producere de ATP) mediat nu de clorofilă, ca la bacteriile fotosintetizante, ci de complexul retinal—proteină reprezentat de bacteriorhodopsină. Procesul are loc în condiții în care fosforilarea oxidativă nu poate avea loc sau este inhibată prin lipsă de O_2 (Oesterhelt, 1973; 1978; Werber, 1980). Energia chemiosmotică produsă când bacte-

riorhodopsina absoarbe lumina poate fi folosită pentru a activa mai multe procese biochimice. Mecanismul de pompare a protonilor în fosforilarea oxidativă și în fotofosforilare este foarte diferit de cel realizat în membrana purpurie, dar, în toate trei cazurile, rezultatul final este același: energia liberă chimică a unor substraturi oxidabile sau energia fotonică a luminii sînt convertite în energia liberă a unui gradient electrochimic protonic. Funcția primară a membranei purpurii este deci de a face din lumină o sursă alternativă de energie față de respirație la *Halobacterium*. Dovada o reprezintă însuși faptul că bacteria nu sintetizează membrana purpurie decît cînd crește la concentrații joase de oxigen și în prezența luminii.

Conversia energiei luminoase la *Halobacterium* este un proces similar fotosintezei, dar mult mai simplu, deoarece membrana purpurie, respectiv bacteriorhodopsina îndeplinește funcția de „pompă de protoni" membranară, care își ia energia direct din energia luminoasă, convertind-o în energie chimică. Acest sistem de conversie a luminii ilustrează perfect teoria chemiosmotică, după care în respirație (fosforilare oxidativă) și fotosinteză (fotofosforilare) o serie de reacții de oxidoreducere determină un curent de electroni și protoni prin membrană, energia derivată fiind, în primul rînd, depozitată în forma unui gradient protonic electrochimic prin membrană. Energia înmagazinată sub această formă este utilizată pentru a forma legătura macroergică (~) a ATP. În cazul membranei purpurii, iluminarea produce un adevărat transport de protoni din interiorul celulei spre exterior: moleculele de bacteriorhodopsină, așezate orientat în membrană, suferă modificări conformaționale tranzitorii cînd absorb lumina. Ele fixează și eliberează protoni în mod unidirecțional, ceea ce produce un gradient de pH prin membrana celulară. Gradientul de pH este o sursă de energie metabolică, deoarece energia electrică rezultată este folosită pentru a face o reacție chimică, respectiv sinteza de ATP (fig. 94).

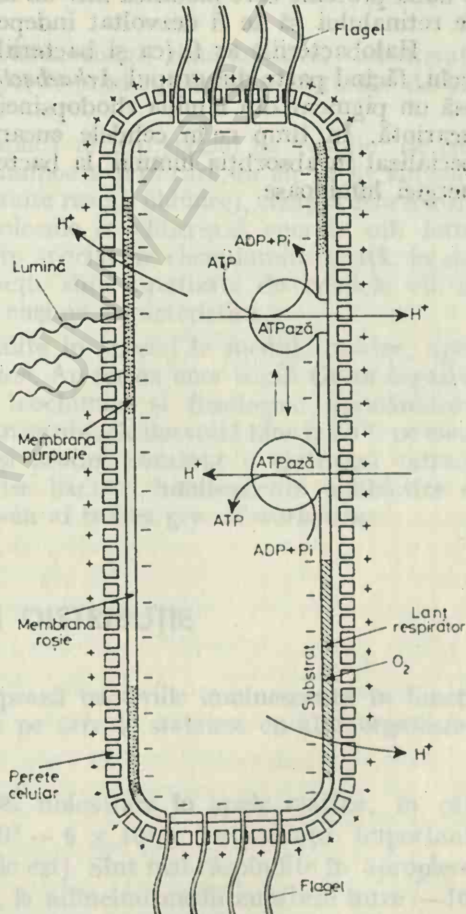


Fig. 94. — Reprezentarea schematică a structurilor membranei celulare de *Halobacterium* și a transportului protonilor în metabolismul energetic (după Oesterhelt, 1976).

Semnificație ecologică. Conversia energiei luminoase la nivelul membranei purpurii reprezintă un mecanism energetic facultativ, capabil să înlocuiască sau să suplimenteze sinteza respiratorie de ATP. El este un mecanism auxiliar, deoarece halobacteriile nu pot utiliza numai lumina ca unică sursă de energie. Chiar în prezența luminii, ele preferă fosforilarea oxidativă, atît timp cît nu sînt lipsite de nutrienți și de O_2. Se pare însă că bacteriorhodopsina poate înlocui metabolismul fermentativ ca sursă de energie, deoarece la halobacteriile cu membrană purpurie nu a fost evidențiată nici o cale metabolică de tip fermentativ.

Semnificație evolutivă. Nu se știe dacă există vreo legătură evolutivă între bacteriorhodopsină și pigmenții vizuali, dar teoretic este puțin probabil ca două proteine care modifică într-un mod similar proprietățile fizicochimice ale retinalului să se fi dezvoltat independent unele de altele.

Halobacteriile ar fi (ca și bacteriile metanogene) organisme extrem de vechi, făcînd parte din grupul *Arhaebacteria* (Werber, 1980), care au dobîndit însă un pigment din familia rhodopsinei prin transferul genelor de la o celulă eucariotă. În timp ce în celulele eucariote complexul retinal—proteină s-a specializat în absorbția luminii, la bacterii și-a păstrat funcția de cuplare a energiei luminoase.

BIOLUMINESCENŢA BACTERIILE LUMINESCENTE

(Pl. 8–10)

Numeroase organisme vii (bacterii, fungi, dinoflagelate, celenterate, anelide, moluşte, crustacee, insecte, peşti) produc fenomene naturale de bioluminescenţă.

Fenomenul de luminescenţă implică un tip special de reacţie, de conversie a energiei chimice în energie luminoasă prin care, în loc să fie eliberată sub formă de căldură (ca în cele mai multe reacţii chimice), energia este folosită pentru excitarea specifică a unei molecule ce eliberează energie sub formă de fotoni. Bioluminescenţa este un tip special de chemiluminescenţă, în care substanţele chimice implicate în reacţie sînt sintetizate de celulele vii, iar interacţiunile lor sînt catalizate de enzime caracteristice.

Bacteriile luminescente, răspîndite în special în mediile marine, aparţin genurilor *Beneckea* şi *Photobacterium*. Au forma unor bacili Gram-negativi, mobili, cu proprietăţi morfologice, biochimice şi fiziologice asemănătoare enterobacteriaceelor. Sînt facultativ anaerobe. Se dezvoltă bine la 25°C pe medii cu glucoză, manoză, galactoză etc. şi produc constant o chitinază extracelulară. În ultimii ani au fost descrise bacterii luminescente simbiotice cu nematodele din sol şi încadrate într-un al treilea gen, *Xenorhabdus*.

HABITAT ŞI DISTRIBUŢIE

Hastings şi Nealson (1979) grupează bacteriile luminescente în funcţie de habitatul lor natural şi asociaţiile pe care le stabilesc cu alte organisme, în următoarele categorii:

1. **Bacteriile luminescente libere**, ubicvitare în apele marine, în care pot ajunge la o densitate de $1 \times 10^3 - 6 \times 10^3$/l, cu variaţii importante sezoniere, în Oceanul Atlantic (zona de est). Sînt mai răspîndite în apropierea coastelor decît în largul oceanelor şi la adîncimi medii cuprinse între —100 şi —1 000 m. Densitatea mai mare la adîncimi mijlocii ar putea fi datorată asocierii lor cu peştii, în organele luminoase şi/sau ca simbionte în intestin, ceea ce ar asigura o eliberare constantă a lor în apa de mare.

2. **Bacteriile luminescente saprofite** au fost descrise pe suprafaţa animalelor marine (peşti şi crustacei), dar şi pe carnea conservată, fiind chiar un

indicator al absenței fenomenelor de alterare prin putrefacție deoarece produc unele substanțe antibiotice.

În secolul al XIX-lea prezența lor a fost semnalată în plăgi umane deschise (Harvey, 1957) și interpretată ca un semn bun, de vindecare a rănilor, probabil tot datorită elaborării de substanțe antibiotice.

3. **Formele comensale** sînt întîlnite în tractul digestiv (unde ajută la digestia chitinei (Robinson, 1977), folosind produsul de degradare al acesteia, N-acetilglucozamina), și pe suprafața unor animale marine (pești, nevertebrate), ale căror dejecții luminescente conțin luciferază extractibilă.

4. **Formele parazite** pot fi grupate în două categorii:

a) *Bacteriile marine*, care infectează țesuturile unor crustacee, au un larg spectru de gazde. Parazitismul lor este corelat cu variațiile sezoniere, iar în cazurile în care se multiplică în hemolimfă fac animalele vizibile. Uneori produc leziuni necrotice ale exoscheletului la unii crabi, datorită chitinazelor bacteriene extracelulare (Baross, 1979).

b) *Bacteriile nemarine* infectează diferite organisme terestre, efemeroptere, furnici, miriapode etc.

Cel mai mult studiate sînt bacteriile luminescente (*Xenorhabdus luminescens*), care infectează unele omizi prin simbioza mutuală dintre bacterii și un gen specific de nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar și colab., 1977). Bacteriile sînt purtate simbiotic în intestinul nematodelor, în număr mic (~ 100 per animal). În stadiul tînăr, nematodele sînt ingerate de omizi, cărora le perforează peretele intestinal, inoculînd bacteriile în hemolimfa acestora, unde se multiplică determinînd infecții și boală. În același timp, ciclul de viață al nematodului este completat în hemocel, iar bacteriile luminescente sînt încorporate la descendenți. Funcția luminescenței ar fi aceea de a ajuta atracția unor noi gazde potențiale (alte omizi) de către nematodele progene și de a asigura dispersia lor. Bacteriile libere ingerate de omizi nu omoară gazdele, pentru că în absența nematodelor ele sînt nepatogene; sînt însă foarte virulente dacă sînt injectate direct în hemocel (1—2 bacterii omoară o omidă), asigurînd în același timp ciclul de viață al nematodului, care în lipsa bacteriilor nu se poate dezvolta.

Bacteriile din organele luminoase

Formele exosimbionte. Există aproximativ 25 de familii de pești „luminoși" care generează lumina proprie, fără să folosească bacteriile luminescente (Herring și Morin, 1978).

În schimb, cel puțin 30 de genuri de pești teleosteeni (aparținînd la 11 familii) au organe specializate, intens vascularizate, pentru a asigura aportul de O_2 și nutrienți, care conțin fotobacterii specifice.

Bacteriile endosimbionte sînt localizate în organele luminoase ale tunicierilor, la care pirosomii răspund la stimuli externi, producînd „fulgerări" de lumină de scurtă durată (o zecime de secundă) asemănătoare blitz-ului fotografic și la care biochimia emisiei de lumină este, probabil, controlată de organismul-gazdă (Mackie și Bone, 1978), (tabelul nr. 29).

Tabelul nr. 29

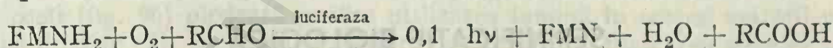
Habitatele şi asocierea bacteriilor luminoase în natură (după Hasting şi Nealson, 1979)

Modul de viaţă*)	Habitatul sau gazda	Specia bacteriană
Nesimbiotic		
— Liber	Apă de mare	*Photobacterium* sp., *Beneckea* sp.
	Sol (?), ape dulci (?)	*Xenorhabdus luminescens* (?)**)
— Saprofit	Animale marine, răni, carne	*Photobacterium*, *Beneckea* sp. *X. luminescens*
Simbiotic nespecific		
— Comensal	Tractul digestiv al peştilor marini şi nevertebratelor marine	*Photobacterium*, *Beneckea* sp.
— Parazitar	Crustacee marine	*P. fischerii*, *P. phosphoreum*, *P. harveyi*
	Animale terestre şi de apă dulce	*X. luminescens* şi specii neidentificate
Simbiotic specific		
— Simbiotic parazitar	Nematode/omizi	*Xenorhabdus luminescens*
— Exosimbionţi în organe luminoase	Peşti teleosteeni (11 familii)	*P. leiognathi*, *P. fischerii*, *P. phosphoreum*
— Endosimbionţi în organe luminoase	Tunicieri	necultivate şi neidentificate

*) Termenul „simbiotic" este folosit în sensul său larg, etimologic („viaţă împreună").
**) Date incerte.

BIOCHIMIA LUMINESCENŢEI BACTERIENE

Reacţia de emitere a luminii de către bacteriile luminescente, catalizată de enzima *luciferaza*, implică oxidarea flavinmononucleotidului redus ($FMNH_2$) şi, concomitent, a unei aldehide alifatice cu lanţ lung (8—16 atomi de C), probabil un tetradecanol (Ulitzur, 1978), după reacţia globală:



$$FMNH_2 + O_2 + RCHO \xrightarrow{\text{luciferaza}} 0{,}1\ h\nu + FMN + H_2O + RCOOH$$

Reacţia este neobişnuit de lentă, deoarece necesită 10 secunde pentru un singur ciclu la temperatura camerei.

Luciferaza bacteriană este o oxidază cu structură relativ simplă, fiind o glicoproteină legată de membrană la *P. leiognathi*, sau avînd o structură heterodimerică cu masa moleculară (M) 79 000, formată din două subunităţi diferite (α M 42 000 dal şi β cu M 37 000 dal la *Beneckea harveyi (Lucibacterium harveyi)*.

Reacţia globală a luciferazei (fig. 95) are ca rezultat producerea de lumină, emiţătorul fiind un complex *luciferază—flavină* a cărui compoziţie chimică exactă nu este încă cunoscută (Hasting şi Nealson, 1979).

În celulele foarte strălucitoare, luciferaza poate reprezenta pînă la 5% din proteina celulară. Emisia de lumină consumă ~ 20% din O_2 total, ceea ce implică un consum energetic ridicat. Fotobacteriile pot fi luminescente în anumite condiţii şi neluminescente în altele, ceea ce demonstrează că

sistemul este inductibil*) și represibil. Intens induse, ele emit între 10^3 și 10^4 cuante/s/celulă ($\lambda = 490$ nm). Pe bază de calcul, s-a stabilit că ar fi necesar un flux minim de 10^8 cuante/s/mm² de suprafață care emite, pentru a asigura vizibilitatea. Aceasta ar corespunde, ținînd seama de diminuarea luminii emise prin absorbție, reflecție etc., la $\sim 10^4 - 10^5$ celule bacteriene într-un

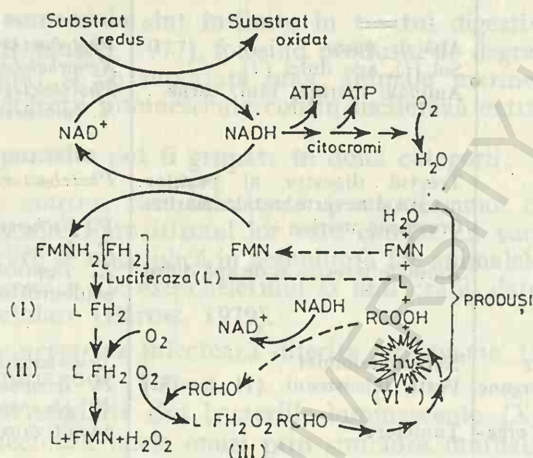


Fig. 95. — Biochimia luminescenței bacteriene (după Hastings și Nealson, 1979). Căile reactanților și intermediarilor sînt prezentate în relație cu metabolismul celular și transferul electronilor. Fiecare ciclu de producere a luminii are nevoie de 1 $FMNH_2$ și 1 NADH.

mm³ de cultură bacteriană (respectiv o densitate celulară de 10^7—10^8 celule/ml). Or, atît culturile din organele luminoase, cît și dezvoltarea saprofită a bacteriilor sînt cel puțin de două ori mai dense și deci mai strălucitoare decît această valoare minimă (Ruby, 1976).

SEMNIFICAȚIE BIOLOGICĂ

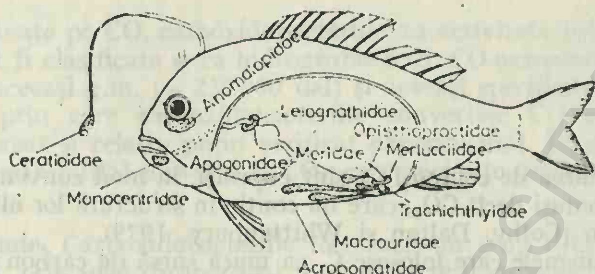
Fenomenul de luminescență bacteriană și sistemul enzimatic care îi asigură funcționarea sînt considerate, de unii autori, ca un sistem vestigial, fără funcții actuale sau folosit originar pentru a detoxifica mici cantități de oxigen molecular.

Descoperirea mecanismelor complexe de control ale biosintezei și activității sistemelor luminescente fac această ipoteză improbabilă. De aceea, cei mai mulți autori consideră în prezent că emisia de lumină are o importanță funcțională și că perceperea ei de către alte organisme creează, în final, o serie de avantaje pentru fotobacterii. Habitatul simbiotic implică, pentru

*) După Nealson și colab. (1970), bacteriile controlează sinteza propriului lor sistem de creștere a unei substanțe *(autoinductor)* care declanșează sinteza constituenților sistemului luminescent.

bacterii, un avantaj natural, deoarece găsesc în organismul gazdei hrană și adăpost față de competitorii lor.

Organismele marine beneficiază de emisia de lumină pe trei căi specifice diferite: a) în favorizarea atacului asupra pradei (atracție și captură); b) în reacțiile de apărare (evitarea prădătorilor) și c) în comunicarea intraspecifică prin iluminarea mediului înconjurător (Morin și colab., 1975).



P. phosphoreum	P. fischeri	P. leiognathi	Necultivabile	Neidentificate
Macrouridae	Monocentridae	Leiognathidae	Ceratioidae	Acropomatidae
Merlucciidae		Apogonidae	Anomalopidae	
Moridae				
Opisthoproctidae				
Trachichthyidae				

Fig. 96. — Reprezentare schematică a localizărilor, mărimii și deschiderilor spre exterior ale organelor luminoase la mai multe familii diferite de pești luminoși („ichthylicht"), care poartă bacterii luminescente simbiotice, ca sursă de lumină. În figură sînt înscriși taxonii bacterieni cunoscuți ca fiind asociați specific cu fiecare grup de pești (după Hastings și Nealson, 1979).

În organele luminoase, ca și în culturi, fotobacteriile emit lumină în mod continuu, dar controlul emisiei la exterior este asigurat de organismul-gazdă, prin unele mecanisme specifice ale acestuia (prezența unui sistem obturator, rotația organului luminos sau prin cromatofori). Peștii ceratoizi *(Ceraticida)* au o structură luminoasă „de momeală" care atrage alte organisme, ce devin pradă (O'Day, 1974). În plus, iluminarea preponderent ventrală a celor mai mulți pești (fig. 96) pledează pentru utilizarea luminii în scopul evitării prădării pe diferite căi: sperierea și abaterea prădătorilor, mascarea siluetei peștelui prin contrailuminare (intensitatea și culoarea luminii emise ventral în cursul zilei se combină cu lumina care coboară de la suprafața apei).

Bacteriile luminescente se dezvoltă intens și emit lumină și în numeroase nișe ecologice, în afara organelor luminoase specifice. Ele ar putea fi rezultatul unor „eliminări oportuniste" sau prin „prea plin" din organele luminoase și, ca urmare, emiterea de lumină nu ar reprezenta un avantaj puternic pozitiv în selecție.

Hastings și Nealson (1979) consideră că, întrucît fotobacteriile sînt enterobacterii marine adevărate (Baumann, 1977), luminescența oferă un avantaj în selecție, corelat cu dispersia și propagarea lor. Dezvoltarea lor pe diferite substraturi ca parazite (pe crustacee) sau saprofite (pe suprafața peștilor morți sau în resturile fecale luminescente) asigură producerea de suficientă lumină pentru a atrage diferite organisme care le ingeră, asigurînd multiplicarea lor și răspîndirea în mediul natural respectiv (Robinson și Morin, 1977).

MICROORGANISMELE CARE FOLOSESC COMPUȘII C_1

Sub denumirea de compuși C_1 sînt cuprinși, în mod convențional, compușii mult mai reduși decît CO_2, care nu conțin în structura lor nici o legătură carbon — carbon (Colby, Dalton și Whittenbury, 1979).

Microorganismele care folosesc C_1 ca unică sursă de carbon pentru creștere aparțin la două grupuri:

a) Microorganismele care oxidează substratul de creștere C_1 la CO_2 sau așa-numitele „autotrofe" care folosesc C_1 (Schlegel, 1975), descrise sub denumirea de *Carboxydobacteria*.

b) Bacteriile metilotrofe (Colby și Zatman, 1979), care pot obține energia din oxidarea substratului de creștere C_1 (metan, metanol și alți compuși C_1 organici), asimilînd C ca formaldehidă sau amestec de formaldehidă și CO_2, întotdeauna pe căi diferite de ciclul Calvin. Deși sînt chemoheterotrofe, aceste bacterii formează un grup fiziologic distinct.

BACTERIILE CARE OXIDEAZĂ MONOOXIDUL DE CARBON

Carboxidobacteriile sînt microorganisme care au capacitatea de a crește aerob pe medii în care CO este singura sursă de carbon și energie. Ele sînt microorganisme chemolitotrofe facultative cu metabolism de tip strict aerob, care se dezvoltă pe medii minerale în prezența a 5—20% (vol/vol) oxigen și 20—95% (vol/vol) monooxid de carbon. Creșterea pe medii cu CO este însoțită de formarea de CO_2. În funcție de condițiile de creștere, 4—16% din CO (Zavarzin, 1977; Meyer și Schlegel, 1978) este convertit în biomasă celulară, iar restul este folosit pentru producerea de energie și oxidat de CO_2 după reacția:



$$2{,}19\ CO + O_2 \rightarrow 1{,}83\ CO_2 + 0{,}36\ C \text{ celular} + \text{energie}$$

Biochimia oxidării CO. Carboxidobacteriile au în comun trei proprietăți fiziologice:

1) Se dezvoltă în prezența unui amestec de $H_2/CO_2/O_2$, chiar mai bine decît într-un amestec de CO/O_2. În primul caz, timpul de dublare a populației este de ~ 6—28 de ore, iar în al doilea de ~ 50 de ore (Meyer, 1980). Densitatea celulară finală este, de asemenea, mai mare de 2—10 ori în cazul bacteriilor cultivate în prezența amestecului de $H_2/CO_2/O_2$ decît în cazul celor

dezvoltate pe CO/O_2 (Nozhevnikova, 1974). Datorită acestor proprietăţi, *Pseudomonas carboxydovorans* poate fi relativ uşor cultivată pe un mediu mineral simplu, în prezenţa CO, sub forma unui amestec de gaze de eşapament auto şi aer, în proporţii egale.

2) Ele formează numai în prezenţa monooxidului de carbon o CO-oxireductază, care asigură oxidarea CO după ecuaţia: $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2e^- + 2H^+$.

3) Cultivate pe CO, carboxidobacteriile au activitate hidrogenazică. De aceea, ele pot fi clasificate şi ca hidrogenbacterii. CO-oxireductazele şi hidrogenazele au aceeaşi g.m. (~ 230 000 dal) şi aceeaşi specificitate de acceptor. Mecanismul prin care carboxidobacteriile convertesc CO în C asimilabil este controversat şi relativ puţin verificat experimental. În general, se consideră că CO este iniţial convertit la CO_2, care apoi este fixat autotrof pe calea ciclului Calvin.

Taxonomie. Carboxidobacteriile formează un grup care s-a amplificat în ultimii ani, prin identificarea mai multor bacterii cu aceste particularităţi fiziologice. Speciei *Pseudomonas carboxidovorans*, cel mai mult studiată, i s-au adăugat altele, ca *Ps. carboxidoflava*, *Ps. carboxidohydrogena*, *Ps. gazotropha*, *Alcaligenes carboxidus*, *Achromobacter carboxidus*, *Comamonas compransoris*, *Seliberia carboxidohydrogena* etc.

Capacitatea de oxidare a CO la CO_2 însă, în anaerobioză este întîlnită la mai multe procariote autotrofe sau heterotrofe, care au proprietatea de a utiliza CO_2 pentru creştere ca, de exemplu, la unele bacterii metanogene, la *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium perfringens*, *Cl. pasteurianum* etc. Ele pot utiliza CO ca sursă de C pentru creştere, dar nu îl pot folosi ca unică sursă de C. De aceea, aceste bacterii nu pot fi considerate ca aparţinînd grupului *Carboxydobacteria*.

Semnificaţie biologică. Bacteriile care oxidează monooxidul de carbon sînt prezente în diferite tipuri de sol, deşeuri organice şi gunoaie, precum şi în bazinele acvatice naturale şi în stratul superior de nămol al apelor poluate.

Monooxidul de C format în regiunile anaerobe ale solului şi la fundul bazinelor acvatice difuzează la suprafaţă unde devine substratul adecvat pentru oxidarea aerobă la CO_2. El este, de asemenea, produs de numeroase organisme (bacterii, plante şi animale) prin degradarea ciclului porfirinic şi al flavonoidelor (Schlegel, 1978). De aceea este foarte răspîndit în natură, deşi în aerul atmosferic este prezent numai ca urme. Oxidarea bacteriană a CO este un proces natural care se produce, spre exemplu, în sol cu o rată globală a consumului de CO de $\sim 5 \cdot 10^{14}$ g/an, ceea ce asigură conversia la CO_2 a ~ 50% din CO total produs în mediu (Liebl şi Seiler, 1976).

Datorită accesibilităţii gazelor reziduale care conţin CO, H_2, CO_2 ş.a. la locul unde sînt produse (furnale, industria chimică sau a cărbunelui, vapoare etc.), se preconizează utilizarea lor directă de carboxidobacterii pentru producerea de biomasă celulară proteică („single cell protein"). Orientativ, Meyer (1980) a demonstrat că gazele de eşapament ale automobilelor rezultate din combustia a 20 l benzină sînt suficiente pentru producerea a 25 g celule bacteriene. Se estimează că utilizarea gazelor reziduale auto pe plan mondial ar permite producerea a 768 694 t masă celulară/an.

MICROORGANISMELE METILOTROFE

Bacteriile metilotrofe sînt organisme care își pot obține energia prin oxidarea grupării metil din componența unor substraturi de creștere cu C_1 (metan, metanol, metilamină), și asimilează C, avînd ca punct de plecare formaldehida sau un amestec de formaldehidă și CO_2, utilizînd totdeauna căi distincte de ciclul lui Calvin (Colby și Zatman, 1972; Quayle și Ferenci, 1978). Unele pot utiliza chiar compuși care conțin două sau mai multe grupări metil dacă nu sînt legate direct una de cealaltă (de exemplu, $CH_3—O—CH_3$).

Sînt chemoheterotrofe (utilizează compuși organici C_1), dar metabolismul lor nu urmează căile obișnuite de utilizare a substanțelor organice cu $C > 1$ și în multe privințe seamănă cu litotrofele, deși asimilează CO_2 numai în cantități mici ca și celelalte heterotrofe (Doelle, 1981). Unele, ca, de exemplu, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, sînt metilotrofe obligate și cresc numai pe metan, metanol, metilamină (Sahm, 1975), în timp ce altele sînt metilotrofe facultative, putînd utiliza, în afară de metanol și metilamine, și alte surse de C și energie (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhodopseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* etc.).

Biochimia oxidării metanului. Bacteriile metilotrofe, care determină oxidarea metanului, recunoscute încă din anul 1958 (Leadbetter și Foster), au fost studiate numai foarte recent, datorită dificultăților de izolare și îmbogățire a culturilor. Oxidarea bacteriană a metanului se poate face pe două căi, care duc la formarea de formaldehidă și formiat.

Prima cale implică oxidarea directă a CH_4 la metanol, în patru trepte succesive (fig. 97) (Ferenci, Strom și Quayle, 1975; Colby, Dalton, Whittenbury, 1979).

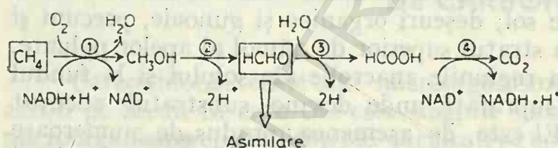
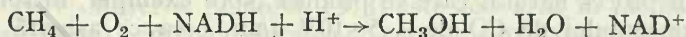


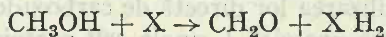
Fig. 97. — Calea de oxidare bacteriană a metanului și metanolului. Cheia enzimelor: 1. Metan monooxigenaza. 2. Metanol-dehidrogenaza. 3. Formaldehid dehidrogenaza. 4. Formiat dehidrogenaza.

1) Reacția inițială este catalizată de *metanmonooxigenază*:



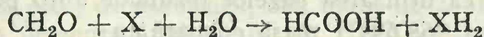
$$CH_4 + O_2 + NADH + H^+ \rightarrow CH_3OH + H_2O + NAD^+$$

2) Metanolul este convertit la formaldehidă, sub acțiunea *metanol dehidrogenazei*:



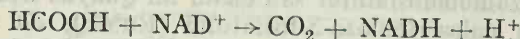
$$CH_3OH + X \rightarrow CH_2O + X\,H_2$$

3) Ulterior, formaldehida formează formiat, sub acțiunea *formaldehid dehidrogenazei*:



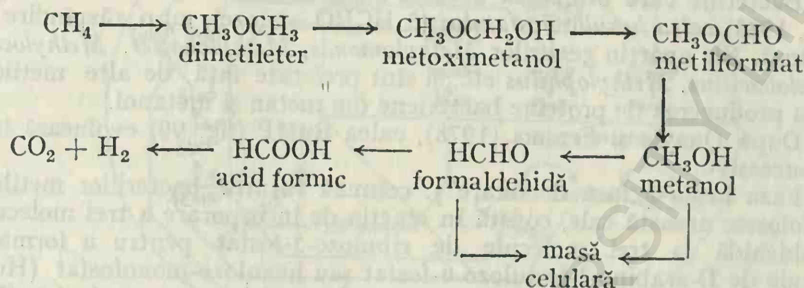
$$CH_2O + X + H_2O \rightarrow HCOOH + XH_2$$

4) Final, formiatul este oxidat la CO_2 sub acţiunea *formiat dehidrogenazei*, cu producere de NADH, necesar pentru etapa iniţială de oxidare a metanului:



$$HCOOH + NAD^+ \rightarrow CO_2 + NADH + H^+$$

În cea de-a doua cale, metanul este oxidat iniţial la dimetileter, după schema:



Ambele căi presupun oxidarea iniţială a metanului şi necesită prezenţa O_2 molecular ca reactant. Aceasta explică, pe de o parte, de ce toate microorganismele care oxidează metanul sînt aerobe obligate şi, pe de altă parte, de ce gazul metan poate rămîne stabil, practic indefinit, în mediile naturale anaerobe, cum sînt zăcămintele de petrol şi cărbune.

Formaldehida ocupă o poziţie centrală în metabolismul bacteriilor metilotrofe, deoarece de la nivelul său metabolismul anabolic se desparte de cel energetic: substratul C_1 poate fi utilizat pentru oxidare completă la CO_2, cu producerea energiei necesare pentru creştere, sau asimilat cu biomasă celulară (fig. 98), în funcţie de natura bacteriilor, pe calea ribulozomonofosfatului sau pe calea serinei.

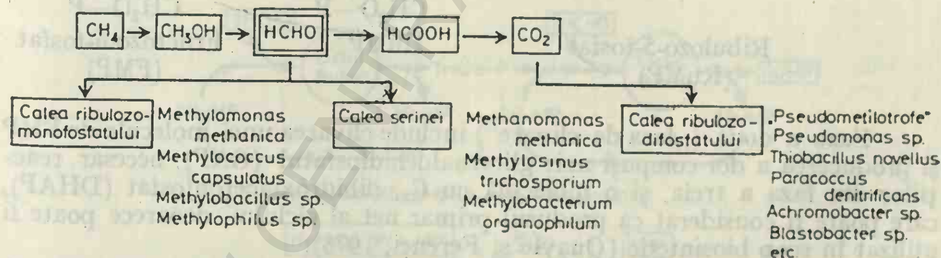


Fig. 98. — Căile de asimilare ale carbonului de către microorganismele metilotrofe şi „pseudometilotrofe", cu menţionarea bacteriilor care le folosesc.

CĂILE DE ASIMILARE ALE CARBONULUI DE CĂTRE BACTERIILE METILOTROFE

Experienţele cu ^{14}C au arătat că asimilarea C de către metilotrofe se realizează pe două căi biochimice principale diferite, corelate cel mai evident cu anumite particularităţi ultrastructurale şi biochimice, ceea ce demonstrează

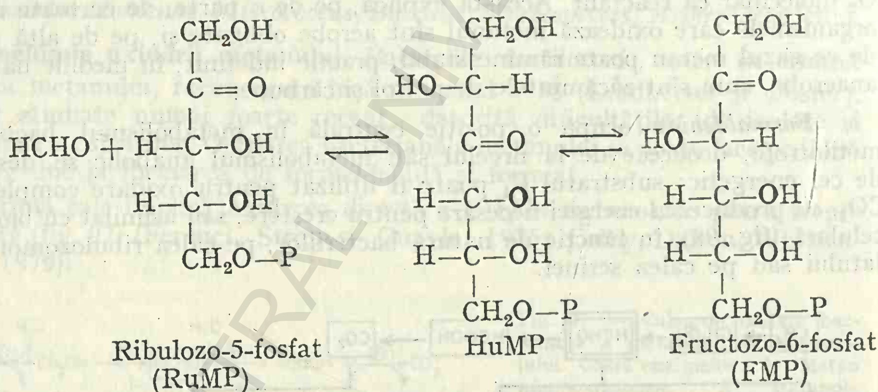
că, probabil, metilotrofia a apărut pe două căi evolutive distincte (Quayle, 1978).

Calea ribulozomonofosfatului sau ciclul lui Quayle. Descoperită de Kemp și Quayle (1966), calea ribulozo-5-fosfatului (RuMP), de asimilare a formaldehidei, este întîlnită în trei variante puțin diferite, avînd o evoluție similară ciclului Benson — Calvin.

Bacteriile care utilizează această cale, denumită de unii autori (Trotsenko, 1983) *calea hexulozofosfatului* (3 HCHO→trioze), au o răspîndire largă în natură. Ele aparțin genurilor *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylobacillus*, *Methylophilus* etc. și sînt preferate față de alte metilotrofe pentru producerea de proteine bacteriene din metan și metanol.

După Quayle și Ferenci (1978), calea RuMP (fig. 99) evoluează în trei faze succesive:

Faza întîia („faza de fixare"), comună tuturor bacteriilor metilotrofe care folosesc această cale, constă în reacția de încorporare a trei molecule de formaldehidă la trei molecule de ribulozo-5-fosfat pentru a forma trei molecule de D-arabino-3-hexulozo-6-fosfat sau hexulozo-monofosfat (HuMP), care este ulterior izomerizat pentru a produce fructozo-monofosfat (FMP), după reacțiile:



Faza a doua („faza de clivare") include clivarea unei molecule de FMP și producerea a doi compuși noi: gliceroaldehidfosfatul (GAP), necesar reacțiilor din faza a treia, și o moleculă cu C_3, dihidroxiacetonfosfat (DHAP), care poate fi considerat ca produsul primar net al ciclului, deoarece poate fi utilizat în scop biosintetic (Quayle și Ferenci, 1978).

Faza a treia („faza de regenerare") conține ansamblul reacțiilor necesare pentru regenerarea de la două molecule de fructozo-6-fosfat a 3 molecule de ribulozo-5-fosfat, necesare pentru închiderea ciclului și asigurarea în continuare a reacțiilor de condensare cu formaldehida.

Fazele II și III urmează căi alternative în funcție de natura bacteriilor metilotrofe. Ciclul RuMP are ca rezultat, pornind de la trei molecule de formaldehidă, după cum reiese din figura 99, sinteza netă de triozofosfat sau piruvat. Dacă triozofosfatul este reciclat, el asigură sinteza netă de tetroze, pentoze și hexozofosfați (fig. 100), furnizînd astfel diferite „schelete" de carbohidrați necesare pentru sinteza pereților celulari, a aminoacizilor aro-

matici, acizilor nucleici și polizaharidelor fără ca să necesite participarea unor enzime adiționale față de cele implicate în ciclul lui Quayle și Ferenci.

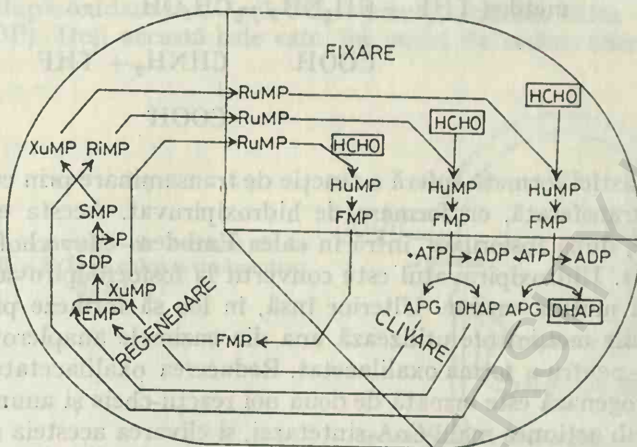


Fig. 99. — Ciclul ribulozomonofosfatului (RuMP) în celula bacteriană (după Quayle și Ferenci, 1978). RuMP — ribulozomonofosfat; HuMP — hexulozo-6-fosfat; FMP — fructozo-6-fosfat; APG — aldehidă 3-fosfoglicerică; DHAP — dehidroxiacetonfosfat; EMP — eritrozo-4-fosfat; SDP — sedoheptulozo difosfat; SMP — sedoheptulozo-7-fosfat; RiMP — ribozo-5-fosfat; XuMP — xilulozo-5-fosfat.

Calea serinei de asimilare a formaldehidei. Propusă de Large, Peel și Quayle (1962), calea serinei (2 HCHO + CO_2 → trioze), numită și calea serin-izocitrat liazei este întîlnită la bacteriile din genurile *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacterium*, *Methanomonas*, care, în general, cresc mai puțin abundent; energetic este mai puțin economică decît calea RuMP.

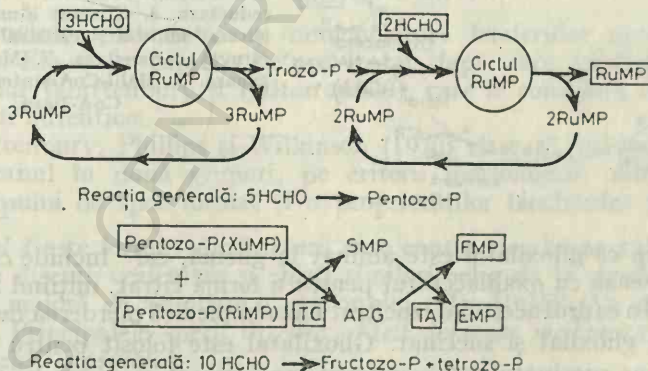
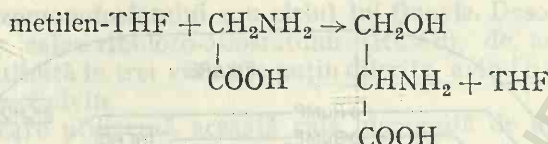


Fig. 100. — Reacțiile care asigură sinteza de tetroze, pentoze și hexoze în ciclul ribulozomonofosfatului: TC — transcetolaza; TA — transaldolaza (după Quayle și Ferenci, 1979).

Descoperită pe baza unor observații de încorporare rapidă a ^{14}C în serină la bacteriile metilotrofe citate, această cale implică legarea inițială a formaldehidei de tetrahidrofolat (THF), cu formare de metilen-tetrahidrofolat

(HCHO+THF → metilen-THF) și ulterior transferul grupării metil la glicocol cu formare de serină, după reacția:



$$\text{metilen-THF} + \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH_2NH_2}} \rightarrow \underset{\displaystyle \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CHNH_2}}}{\underset{|}{CH_2OH}} + \text{THF}$$

Serina astfel formată suferă o reacție de transaminare prin care gruparea amino este transferată, cu formare de hidroxipiruvat. Acesta este redus la glicerat, care, după fosforilare, intră în calea Embden—Meyerhof—Parnas ca 3-fosfoglicerat. Hidroxipiruvatul este convertit la fosfoenolpiruvat (PEP) sub acțiunea mai multor enzime. Ulterior însă, în loc să formeze piruvat de la PEP, bacteriile metilotrofe utilizează una din enzimele anaplerotice — PEP-carboxilaza—pentru a forma oxalilacetat. Reducerea oxalilacetatului de către malat dehidrogenază este urmată de două noi reacții-cheie și anume, formarea malil-CoA, sub acțiunea malil-CoA-sintetazei, și clivarea acesteia sub acțiunea malil-CoA-liazei, care furnizează celulei acetil-CoA și glioxilat (fig. 101). Rezultatul căii serinei este producerea de acetil-CoA de la CH_2O și CO_2.

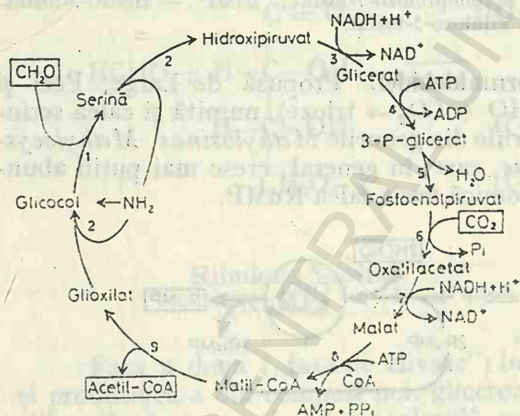


Fig. 101. — Formarea de acetil-CoA de la formaldehidă și CO_2 pe calea serinei. Cheia enzimelor: 1. Serinhidroximetilaza. 2. Transaminaza. 3. Hidroxipiruvat reductaza. 4. Glicerat kinaza. 5. Fosfoglicerat mutaza și enolaza. 6. Fosfoenolpiruvat carboxilaza. 7. Malat dehidrogenaza. 8. Malil-CoA-sintetaza. 9. Malil CoA-liaza.

În timp ce glioxilatul este aminat la glicină, care închide ciclul, acetil-CoA condensează cu oxalilacetatul pentru a forma citrat, inițiind astfel un al doilea ciclu. În cadrul acestuia, izocitrat liaza împiedică pierderea de C și asigură formarea de glioxilat și succinat. Glioxilatul este folosit pentru producerea de glicocol, iar succinatul este convertit via fumarat și malat la oxalilacetat. În felul acesta, al doilea ciclu funcționează în asimilarea C, asigurînd formarea netă de succinat de la 2 CH_2O și 2 CO_2 (fig. 102). Ciclul glioxilatului modificat asigură formarea intermediarilor pentru biosinteza aminoacizilor, și, de asemenea, carbonul care circulă pe calea gluconeogenezei la precursorii biosintezei de ARN și ADN.

Microorganismele „pseudometilotrofe". În opoziție cu bacteriile metilotrofe obligate, care folosesc fie calea serinei, fie calea RuMP, unele microorganisme, numite „pseudometilotrofe" (Zatman și Trotsenko, 1983), pot asimila metanolul după oxidare la CO_2 (3 CO_2→trioze), utilizînd calea ribulozodifosfatului (RDP). Deși această cale este din punct de vedere energetic cea mai

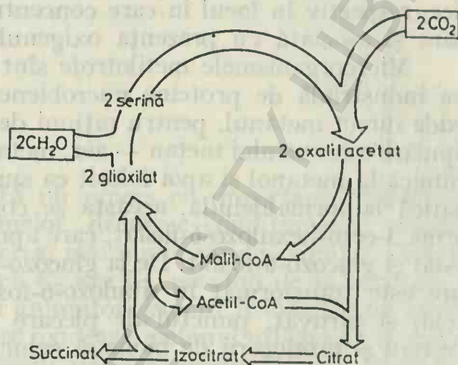


Fig. 102. — Formarea de succinat de la formaldehidă și CO_2, pe calea serin-izocitrat liazei.

nefavorabilă, ea este întîlnită frecvent în metabolismul metanolului, în special la bacteriile din genurile *Pseudomonas, Paracoccus, Achromobacter, Mycobacterium, Blastobacter, Renobacter* etc.

După Trotsenko (1983), împărțirea bacteriilor care folosesc metanul sau metanolul în trei grupuri, în funcție de calea de asimilare primară a C_1, este convențională, deoarece în unele cazuri aceste căi pot funcționa simultan. Astfel, la bacteria metanotrofă obligată *Methylococcus capsulatus*, care asimilează în principal pe calea RuMP, funcționează și calea RDP și cea a serinei. Aceasta demonstrează flexibilitatea metabolică și înrudirea evolutivă foarte strînsă între bacteriile metilotrofe și cele autotrofe.

Taxonomie. Sistematica și nomenclatura bacteriilor metilotrofe sînt discutabile. Ele au un caracter de provizorat, fapt care explică punctul de vedere al lui Whittenbury și Dalton (1970), care le consideră ca „specii" și nu ca specii autentice.

Whittenbury, Phillips și Wilkinson (1970) clasează bacteriile care oxidează metanul în două grupuri, pe criterii morfologice, ultrastructurale, pe baza tipului de spor format și a proprietăților biochimice și fiziologice.

Tipul I este format din bacterii care conțin membrane sub forma unor pachete de discuri veziculare și chiști similari celor de la *Azotobacter*, avînd drept cale majoră de asimilare a carbonului calea RuMP. Au un ciclu Krebs incomplet. Principalele specii tip sînt: *Methylomonas methanica, M. albus* și *Methalococcus capsulatus*.

Tipul II cuprinde bacterii cu membrane aranjate perechi, în jurul periferiei celulare, care formează exospori sau chiști ce conțin lipide și asimilează C pe cale serinei. Au un ciclu Krebs complet. Principalele „specii" reprezentative sînt: *Methanomonas methanooxydans, Methylosinus trichosporium* și bacteria metilotrofă facultativă *Methylobacterium organophilum* (care utilizează pentru creștere și glucoza).

Semnificație biologică. Bacteriile metilotrofe sînt prezente normal în diferite tipuri de sol, în ape (lacuri, rîuri, estuare, mlaștini), în canale și, în general, în toate mediile în care metanul este prezent, nu ca rezultat al pierderilor din rezervoarele naturale de gaz metan, ci ca produs al activității bacteriilor anaerobe metanogene. Numărul cel mai mare de bacterii metilotrofe este întîlnit în/sau pe suprafața sedimentelor și deasupra nămolurilor organice, respectiv în locul în care concentrația metanului ce se degajă este mai mare și asociată cu prezența oxigenului liber.

Microorganismele metilotrofe sînt utilizate în practică pentru producerea industrială de proteine microbiene („single cell protein"). Deși ele pot oxida direct metanul, pentru rațiuni de securitate, decurgînd din riscul manipulării amestecului metan — aer, metanul este convertit inițial prin oxidare chimică la metanol și apoi folosit ca sursă de C și energie. După oxidare enzimatică la formaldehidă, aceasta se combină cu ribulozo-5-fosfat, pentru a forma 3-ceto-hexulozo-6-fosfat, care apoi este convertit succesiv la fructozo-6-fosfat și glucozo-6-fosfat. De la glucozo-6-fosfat se formează -6- fosfogluconat, care este transformat în ribulozo-6-fosfat (eliberat pentru a relua un nou ciclu) și piruvat, punctul de plecare pentru formarea compușilor necesari creșterii și producerii de biomasă celulară (fig. 103).

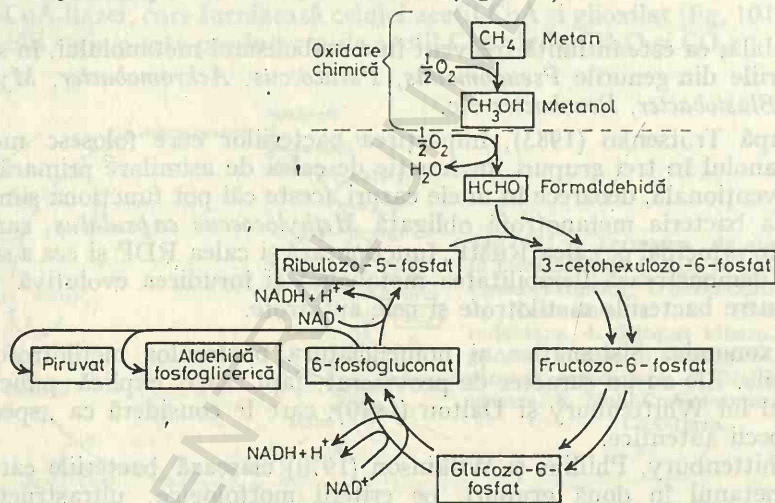


Fig. 103. — Schema conversiei metanului și metanolului la piruvat, în procesul de biosinteză a proteinelor („Single cell protein") de către bacteria *Methylophilus methylotrophus*. Piruvatul este punctul de plecare pentru formarea compușilor necesari pentru creștere.

Metanolul reprezintă un substrat ușor de obținut în stare pură de la o gamă largă de materiale pe bază de hidrocarburi, în cantități mari. Are avantajul unei calități uniforme, al valorii energetice ridicate și al solubilității mari în apă. Microorganismul utilizat în mod obișnuit este *Methylophilus methylotrophus*, care în culturi continue are o mare stabilitate și eficiență în asimilarea metanolului și o rată de creștere rapidă, ce asigură obținerea unei cantități mari de proteine cu valoare nutritivă ridicată, lipsite de hidrocarburi policiclice — potențial cancerigene — și lipsite de toxicitate și patogenitate (Phaff, 1981; Wiseman, 1983).

ASIMILAREA COMPUȘILOR C_1 DE CĂTRE MICROORGANISME

(Pl. 11)

Asimilarea carbonului reprezintă un proces cu importanță fundamentală în metabolismul microorganismelor, deoarece condiționează creșterea și multiplicarea acestora. Au fost descrise mai multe căi de asimilare care pot furniza microorganismelor molecule cu C_3 sau C_4, pornind de la compuși C_1, și este probabil că unele căi specifice anumitor grupuri fiziologice nu au fost încă descoperite. Microorganismele care oxidează metanul utilizează, în funcție de natura lor, două căi specifice: ciclul ribulozomonofosfatului (RuMP) și calea serinei (vezi cap. „Microorganismele metilotrofe").

ASIMILAREA CO_2. REACȚIILE CICLULUI CALVIN

Cele mai multe organisme autotrofe utilizează ca singură sursă de C celular CO_2 și sînt numite, din această cauză, C-autotrofe. Calea principală prin care CO_2 este încorporat în substanțe organice a fost descrisă de Calvin, Benson și Bassham (1946), utilizînd algele verzi unicelulare *Chlorella pyrenoidosa* și *Scenedesmus obliquus* și CO_2 marcat cu ^{14}C, și este cunoscută sub denumirea de *ciclul ribulozodifosfatului (RuDP)* sau ciclul lui Calvin (fig. 104).

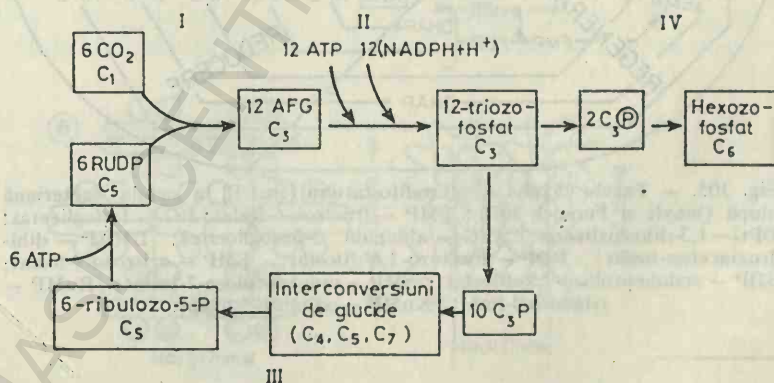
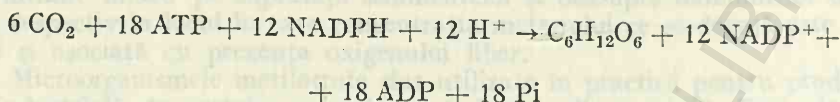


Fig. 104. — Prezentarea simplificată a ciclului Calvin. Cifrele romane I—IV se referă la cele patru stadii ale procesului. AFG — acid 3-fosfogliceric; RUDP — ribulozo-1,5-difosfat. Faza de fixare (I) și de reducere (II): $6CO_2+6C_5 \rightarrow 10\ C_3 + C_6$. Faza de regenerare (III): $10\ C_3 \rightarrow 6\ C_5$. Faza de sinteză (IV): $2C_3P \rightarrow C_6$.

Prin acest ciclu, microorganismele foto- și cele chimioautotrofe convertesc CO_2 în material celular, printr-un proces foarte endergonic, care necesită un consum de 18 moli de ATP și 12 moli de NADPH, pentru fiecare mol de hexozomonofosfat format (respectiv 3 moli de ATP și 2 moli de NADPH per mol de CO_2 asimilat*)) după reacția globală:



$$6\,CO_2 + 18\,ATP + 12\,NADPH + 12\,H^+ \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 12\,NADP^+ + 18\,ADP + 18\,Pi$$

Reacțiile ciclului lui Calvin pot fi împărțite în patru faze: *faza de carboxilare* (CO_2 + ribulozodifosfat → două molecule de acid 3-fosfogliceric), *faza de reducere* (acid 3-fosfogliceric → triozofosfat), *faza de regenerare* (triozofosfat → ribulozo-difosfat), căreia îi urmează *faza de sinteză a materialului celular* (acid fosfogliceric → triozofosfat → glucide ș.a.) (fig. 105).

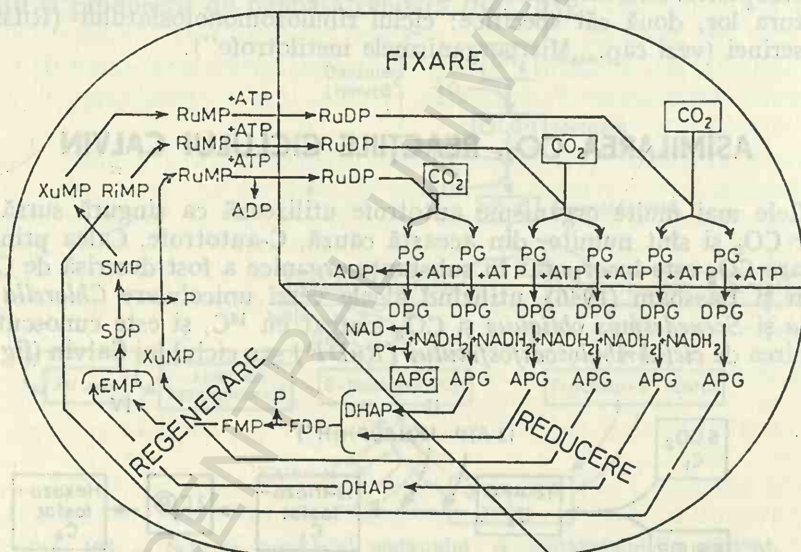
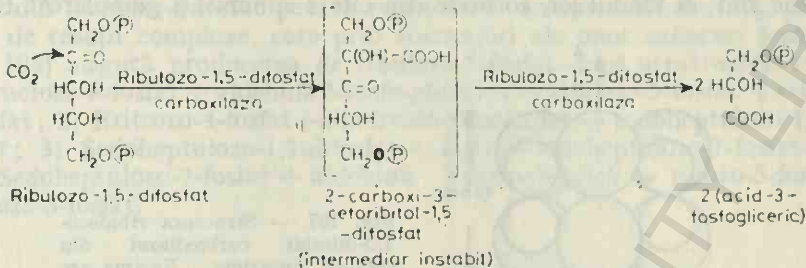


Fig. 105. — Fazele ciclului ribulozodifosfatului (RuDP) în celula bacteriană (după Quayle și Ferenci, 1978). FMP — fructozo-6-fosfat; PG — fosfoglicerat; DPG — 1,3-difosfoglicerat; APG — aldehidă 3-fosfoglicerică; DHAP — dihidroxiaceton-fosfat; FDP — fructozo-1,6-difosfat; EMP — eritrozo-4-fosfat; SDP — sedoheptulozo-1,7-difosfat; SMP — sedoheptulozo-7-fosfat; RuMP — ribulozo-5-fosfat; XuMP — xilulozo-5-fosfat.

---

*) Deoarece în fotofosforilarea oxigenică se produc cantități echimoleculare de NADPH și de ATP, este absolut necesară prezența fotofosforilării ciclice, care asigură nevoia adițională de ATP. Ea nu este necesară în fotosinteza anoxigenică, în care se poate produce NADPH adițional, direct în cursul reacțiilor la întuneric. Ca urmare, fotosinteza oxigenică necesită ambele tipuri de fotofosforilare, iar cea anoxigenică, predominant fotofosforilarea ciclică (Doelle, 1981).

Faza de fixare a CO_2 (carboxilare) este efectuată sub acţiunea ribulozo-1,5-difosfat-carboxilazei, care determină reacţia ribulozo-1,5-difosfatului (acceptorul special de CO_2), cu bioxidul de carbon pentru a forma două molecule de acid 3-fosfogliceric, primul intermediar stabil şi produsul primar al fixării CO_2:



Ribulozo-1,5-difosfat carboxilaza, enzimă esenţială a ciclului Calvin, izolată de la mai multe bacterii (fig. 106) este, uneori, similară celor descrise la alge şi plante, la care formează aproape jumătate din proteinele solubile ale stromei, reprezentînd, după Berkaloff (1981), ţinînd seama de biomasa imensă a organismelor fototrofe proteina cea mai abundentă din natură. Are o masă moleculară de ~ 515 000—570 000 dal. Enzima izolată de la

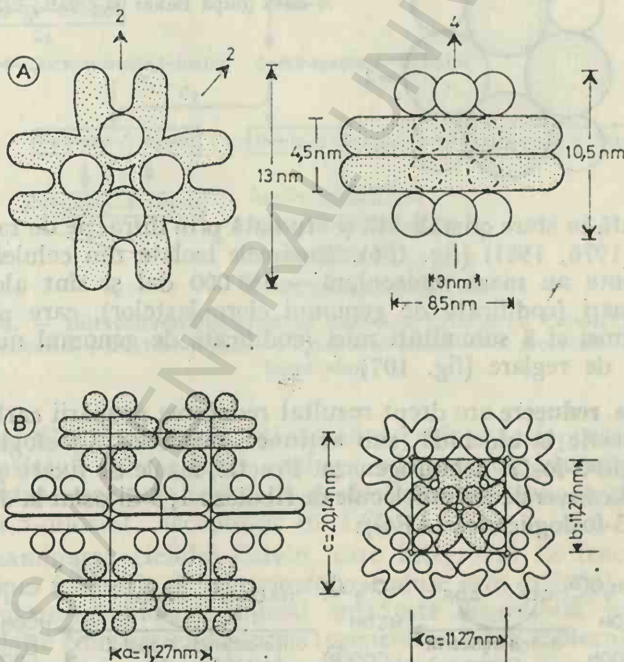


Fig. 106. — A. Model de structură a ribulozodifosfat carboxilazei izolată de la *Alcaligenes eutrophus*, evidenţiind aranjarea subunităţilor, simetria şi dimensiunile moleculei. B. Gruparea moleculelor într-o unitate cristalină. Enzima cristalizată are simetria 2: 2: 2 (după Bowien şi Schlegel, 1981).

Alcaligenes eutrophus apare la microscopul electronic ca formată din 16 subunități (8 mari și 8 mici), aranjate după o simetrie 4: 2: 2. Dimensiunile moleculei sînt de 13 × 13 × 10,5 nm și rezultă din așezarea subunităților în patru straturi suprapuse. Cele două straturi centrale sînt formate din 4 subunități în formă de U, așezate perpendicular pe un ax de simetrie de tip P. Straturile externe sînt, la rîndul lor, formate din cîte 4 subunități globulare*). Enzima

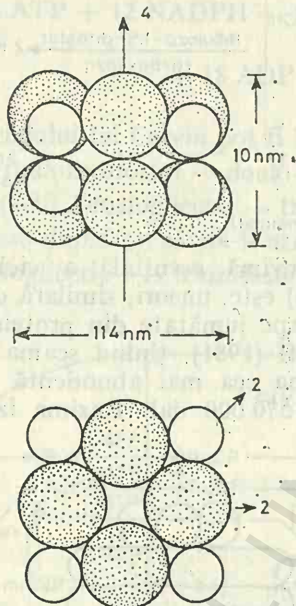
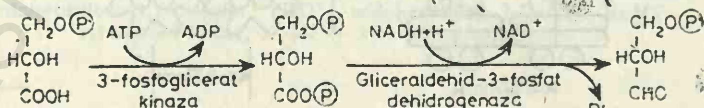


Fig. 107. — Structura ribulozo-1,5-difosfat carboxilazei din celulele eucariote. Enzima are subunități mari, codificate de genomul cloroplastelor, și 8 subunități mici, codificate de genomul nuclear, dispuse în două straturi. Schema prezintă axele de simetrie de tip 2 și tip 4 ale complexului enzimatic. Poziția exactă a subunităților nu este complet elucidată (după Baker și colab., 1977).

a fost obținută în stare cristalizată și studiată prin difracție de raze X (Bowien și Schlegel, 1976, 1981) (fig. 106). Enzimele izolate din celulele fotosintetizante eucariote au masa moleculară ~ 550 000 dal și sînt alcătuite din 8 subunități mari (codificate de genomul cloroplastelor), care poartă situsul activ al enzimei și 8 subunități mici (codificate de genomul nuclear), avînd probabil rol de reglare (fig. 107).

Faza de reducere are drept rezultat reducerea grupării carboxil a acidului 3-fosfogliceric la aldehidă, sub acțiunea enzimelor 3-fosfoglicerat kinaza și gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. Practic, fazele de fixare și de reducere a CO_2 asigură conversia unei molecule de ribulozo-1, 5-difosfat la două molecule de aldehidă 3-fosfoglicerică (AFG):



*) Enzimele izolate de la *Pseudomonas facilis* au o structură similară, în timp ce la *Rhodospirillum rubrum* și *Thiobacillus intermedius* sînt alcătuite numai din două, respectiv opt subunități mari.

În fazele a treia și a patra au loc **regenerarea acceptorului de CO_2**, ribulozo-1,5-difosfatul, și **sinteza** unei molecule de hexoză. Dacă întreaga cantitate de acid 3-fosfogliceric ar fi folosită exclusiv pentru biosinteza hexozelor, ciclul lui Calvin ar ajunge la un impas, din cauza lipsei de ribulozo-5-fosfat. De aceea, o parte din aldehida 3-fosfoglicerică este utilizată împreună cu o parte din fructozo-6-fosfat pentru regenerarea acceptorului de CO_2, printr-o serie de reacții complexe, care prin rearanjări ale unor zaharuri fosforilate (fig. 108) asigură producerea de ribulozo-5-fosfat după următoarele reacții: 1) Fructozo-6-fosfat + aldehidă 3-fosfo-glicerică → xilulozo-5-fosfat + eritrozo-4-fosfat; 2) Eritrozo-4-fosfat + dihidroxiacetonfosfat → sedoheptulozo-1,7, difosfat; 3) Sedoheptulozo-1,7-difosfat + H_2O → sedoheptulozo-7-fosfat + Pi; 4) Sedoheptulozo-7-fosfat + aldehidă 3-fosfoglicerică → ribozo-5-fosfat + xilulozo-5-fosfat.

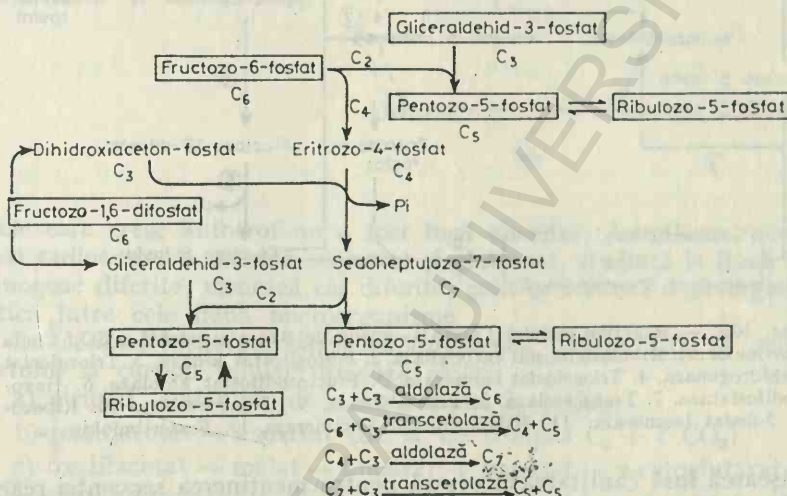


Fig. 108. — Interconversia zaharurilor fosforilate în ciclul lui Calvin (aldehidă 3-fosfoglicerică + fructozo-6-fosfat + fructozodifosfat → 3 molecule de pentozofosfat).

În final, xilulozo-5-fosfat, sub acțiunea enzimei fosfopentozo epimeraza, și ribozo-5-fosfatul, sub acțiunea enzimei ribozofosfat izomeraza, formează ribulozo-5-fosfat, care este convertit de fosforibulokinază, în prezența ATP, la ribulozo-1,5-difosfat, acceptorul de CO_2.

Din examinarea ciclului Calvin, care integrează 12 reacții (fig. 109), rezultă că din 6 molecule de triozofosfat, produse prin carboxilarea a 3 molecule de ribulozo-1,5-difosfat, numai una este disponibilă pentru sinteza hexozei, celelalte cinci servind pentru regenerarea a trei molecule de acceptor consumate. Întrucît o moleculă de hexoză este formată din două molecule de trioze, rezultă că trebuie produse 12 molecule de triozofosfat pentru a sintetiza o moleculă de hexoză. Deși fig. 104 ilustrează numai sinteza unei molecule de hexoză de la 6 CO_2 prin ciclul lui Calvin, este de menționat că mai mulți intermediari ai ciclului pot fi deviați și utilizați pentru sinteza constituenților

celulari (spre exemplu: 3-fosfogliceratul poate duce la piruvat pe calea EMP, eritrozo-4-fosfat poate duce la sinteza aminoacizilor aromatici, iar ribozo-5-fosfat la sinteza nucleotidelor). Cantitatea intermediarilor deviați nu trebuie

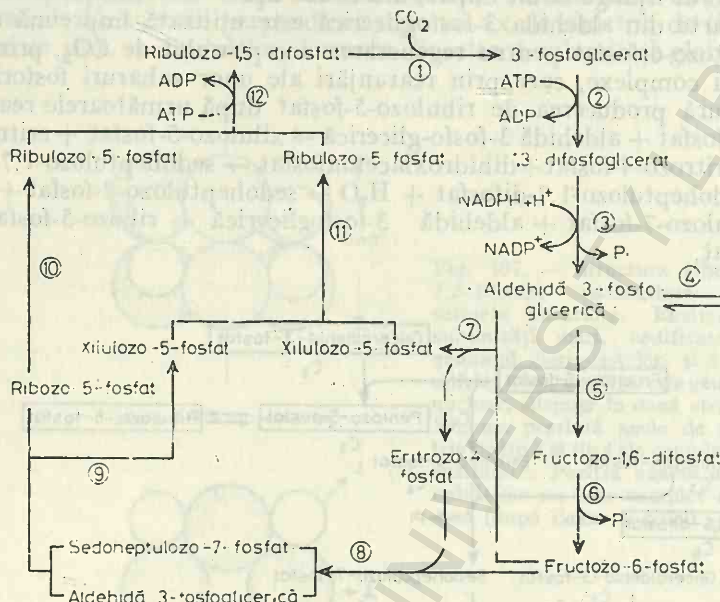


Fig. 109. — Reacțiile ciclului CalvinB—enson de fixare autotrofă a CO_2. Cheia enzimelor: 1. Ribulozodifosfat carboxilaza. 2. Fosfoglicerat kinaza. 3. Triozofosfat dehidrogenaza. 4. Triozofosfat izomeraza. 5. Fructozodifosfat aldolaza. 6. Hexozodifosfataza. 7. Transcetolaza. 8. Transaldolaza. 9. Transcetolaza. 10. Ribozo-5-fosfat izomeraza. 11. Ribulozofosfat-3-epimeraza. 13. Fosforibulokinaza.

să depășească însă cantitatea necesară pentru menținerea secvenței reacțiilor din ciclu. Cele mai multe reacții ale ciclului Calvin, corespunzînd ultimelor două faze, sînt efectuate de enzime cu foarte largă răspîndire în natură și aparțin unor reacții esențiale pentru metabolism în general. Numai două reacții — cele din faza de fixare a CO_2 — sînt specifice organismelor care utilizează CO_2, ca unică sursă de C. De aceea, prezența enzimelor corespunzătoare (ribulozodifosfat carboxilaza și fosforibulokinaza) reprezintă un marker biochimic pentru fotoautotrofe și chemoautotrofe, în raport cu microorganismele heterotrofe.

ASIMILAREA CO_2 DE CĂTRE BACTERIILE METANOGENE

Taylor (1976), Weimer și Zeikus (1979) au demonstrat absența principalelor enzime ale căilor convenționale de fixare a CO_2 la bacteriile metanogene, sugerînd existența unor căi alternative. În același timp, Fuchs și Stupperich (1978) și separat Weimer și Zeikus (1979) au arătat că foarte multe bacterii metanogene asimilează acetatul, care poate furniza pînă la 60%

din C celular. Pe baza datelor experimentale a diferiţi autori, Balch şi colab. (1979) propun o schemă de fixare a CO_2 (fig. 110) în care, deşi acetatul este un precursor important al C celular, mecanismul sintezei sale de la CO_2 în

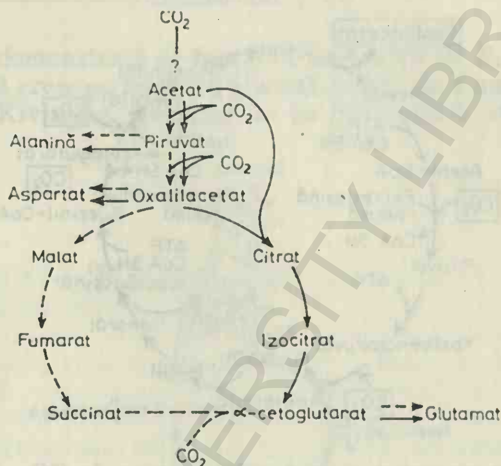


Fig. 110. — Calea de fixare a CO_2 şi de asimilare a acetatului în carbon celular la *Methanobacterium thermoautotrophicum* (———) şi la *Methanosarcina barkerii* (------) (după Balch şi colab., 1979).

celulele care cresc autotrof nu a fost încă elucidat. Asimilarea acetatului, marcat radioactiv, la alanină, aspartat şi glutamat, studiată la două bacterii metanogene diferite, urmează căi diferite, ceea ce reflectă o divergenţă filogenetică între cele două microorganisme.

La *Methanobacterium thermoautotrophicum*, fixarea CO_2 şi asimilarea acetatului la carbon celular urmează căile:

a) piruvat → alanină (de la un compus $C_2 + CO_2$)

b) oxalilacetat → aspartat (de la un compus $C_2 + 2\ CO_2$)

c) oxalilacetat → malat → fumarat → succinat → α-cetoglutarat → glutamat

La *M. barkerii*, calea de asimilare diferă, în sensul că sinteza de glutamat urmează calea:

oxalilacetat → citrat → izocitrat → α-cetoglutarat → glutamat.

CALEA ACETIL-CoA DE FIXARE A CO_2

Studiul mecanismului fixării autotrofe a CO_2 la bacteria fototrofă verde *Chlorobium limicola* (forma *thiosulfatophilum)* a arătat absenţa enzimelor esenţiale ale ciclului Calvin şi, totodată, prezenţa unui set neobişnuit de enzime carboxilante ca: piruvat sintetaza, fosfoenolpiruvat carboxilaza, α-cetoglutarat sintetaza şi izocitrat dehidrogenaza.

Pe această bază, Buchanan (1973), precum şi Fuchs şi colab.(1980) au propus o nouă cale ciclică de asimilare autotrofă a CO_2, numită *ciclul reductiv al acizilor tricarboxilici*, sau după Rose (1976), mai exact, *calea*

acetil-CoA (fig. 111), demonstrată prin experiențe de marcare cu ^{14}C (Sirevag, 1977). Prin această cale, care implică reversia celor mai multe reacții ale ciclului Krebs, se realizează sinteza netă a unei molecule de oxalilacetat din 4 CO_2

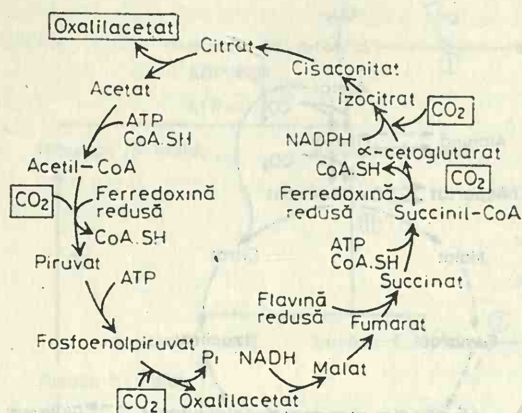


Fig. 111. — Calea acetil-CoA pentru fixarea CO_2 (sinteza piruvatului prin carboxilarea reductivă a acetil-CoA) (după Rose, 1976).

și regenerarea acceptorului primar de CO_2, acetil-CoA. Lucrînd cu bacteria *M. thermoautotrophicum*, Fuchs și Stupperich (1980) au demonstrat că și la aceasta sinteza piruvatului se realizează în proporție de 80 % pe calea carboxilării reductive a acetil-CoA și că, în această cale de fixare autotrofă a CO_2 hexozofosfații și pentozofosfații sînt sintetizați de la CO_2, via acetil-CoA și piruvat.

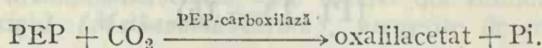
FIXAREA HETEROTROFĂ A CO_2

Spre deosebire de autotrofe care folosesc C sub formă de CO_2, heterotrofele au drept caracter definitoriu utilizarea C din surse organice. Existența unui proces neașteptat de fixare a CO_2, descrisă de Wood și Werkman (1935) la o bacterie heterotrofă care fermentează glicerolul la propionat, a fost confirmată de cercetările efectuate cu C radioactiv. Acestea au demonstrat că *toate heterotrofele asimilează CO_2*, dar că în stoichiometria metabolismului acest proces este, de regulă, mascat prin producerea unei cantități de CO_2 mai mare decît cea fixată.

Analiza căilor biosintetice a permis identificarea mai multor reacții de fixare heterotrofă a CO_2 de către microorganisme, care duc la asimilarea lui în purine, pirimidine și mai mulți aminoacizi.

1) Calea cea mai frecventă este reprezentată de reacția PEP-carboxilazei, care funcționează ca o secvență anaplerotică pentru întreținerea ciclului Krebs. După cum am arătat, acest ciclu funcționează nu numai pentru a regenera nucleotidele piridinice și flavinice reduse pentru lanțul respirator, ci furnizează și material de plecare pentru biosinteze. În cazul *E. coli*, care crește pe glucoză, intermediarii ciclului Krebs sînt folosiți pentru sinteza de porfirine, ca și pentru sinteza aspartatului, glutamatului și a numeroșilor

lor derivați (fig. 112). Producerea oxalilacetatului necesar este asigurată de reacția PEP-carboxilazei:



$$PEP + CO_2 \xrightarrow{\text{PEP-carboxilază}} \text{oxalilacetat} + Pi.$$

Existența acestei căi este demonstrată de faptul că mutantele de *E. coli* care nu produc PEP-carboxilază cresc pe medii cu glucoză numai dacă mediul conține intermediari ai ciclului Krebs sau precursori ai lor (Gottschalk, 1978).

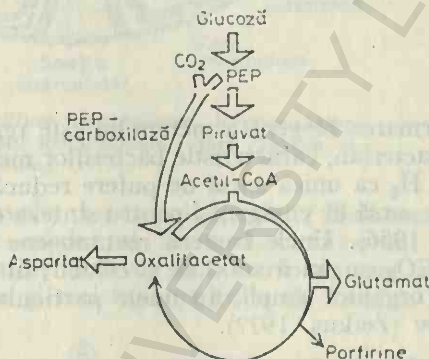


Fig. 112. — Funcția PEP-carboxilazei ca enzimă anaplerotică în cursul cultivării *E. coli* pe mediu cu glucoză (după Gottschalk, 1979).

2) A doua cale este reprezentată de formarea de carbamilfosfat, care contribuie la sinteza argininei și la formarea C_2 din ciclul pirimidinei (C_4 din molecula de pirimidină ia naștere tot de la CO_2, via aspartat).

3) Cea de-a treia cale constă în adiția de CO_2 la 5-aminoimidazol-ribotid, contribuind la formarea C_6 al purinei.

Fixarea CO_2 are totuși o importanță minoră în metabolismul heterotrofelor (în comparație cu fixarea autotrofă), deoarece ele își obțin cea mai mare parte a C celular din surse organice. Capacitatea limitată a heterotrofelor de a reduce CO_2 determină incapacitatea lor de a asigura pe această cale sinteza netă a unui intermediar amfibolic și, de aceea, are numai o valoare redusă pentru biosinteze.

METANOGENEZA ȘI MICROORGANISMELE METANOGENE

(Pl. 13—15)

Formarea biogenă a metanului este rezultatul unui tip special de metabolism bacterian, caracteristic bacteriilor metanogene, care au proprietatea de a utiliza H_2 ca unică sursă de putere reducătoare pentru metanogeneză (respectiv ca sursă de energie) și pentru sinteza compușilor celulari cu C de la CO_2 (Barker, 1956). Unele bacterii metanogene sînt strict chemolitoautotrofe și folosesc CO_2 ca unică sursă de C celular, în timp ce altele, care pot utiliza și compuși organici simpli, au unele particularități ale microorganismelor fermentative (Zeikus, 1977).

Morfologie. Bacteriile metanogene formează un grup cu forme variate, aparținînd la patru tipuri morfologice de bază: — coci cu formă sferică, elipsoidală, izolați sau grupați în perechi (*Methanococcus*); — agregate formate din coci neregulați (*Methanosarcina*); — bacterii cilindrice adesea încurbate, prezente în filamente sau lanțuri lungi (*Methanobacterium*); — celule de tip spiralat cu o structură unică în lumea bacteriană (*Methanospirillum hungatii*).

Această ultimă bacterie conține un component structural terminal neobișnuit, probabil lipsit de citoplasmă, delimitat de învelișul extern al peretelui celular, care îl separă de peretele intern și de membrana plasmatică. Învelișul extern al peretelui celular este format din subunități aranjate în benzi suprapuse (ca monedele într-un fișic) și este probabil fragil, deoarece frecvent apar breșe în structura sa. Celulele individuale au forma unor bastonașe lungi, subțiri și încurbate, ce se divid, formînd filamente spiralate care se conectează prin intermediul unor structuri accesorii sau „compartimente intercelulare" numite „distanțieri celulari" („cell spacers"), asemănătoare burdufurilor care leagă două vagoane de tren, dar în acest caz avînd rolul de a separa celulele individuale din filament. Aceste structuri sînt delimitate la periferie de peretele extern și de septuri distincte („elementele structurale") care au o structură similară celei a peretelui extern, avînd probabil funcția de suport. „Distanțierii" celulari sînt zone în mod special fragile, la nivelul cărora celulele filamentoase au tendința de a se rupe (fig. 113).

Peretele celular are o structură variabilă. La *Methanobacteriales* este tristratificat (grosime ~ 30—40 nm) și prezintă un peptidoglican — *pseudomureina* — diferit de cel tipic bacterian (fig. 114) prin absența acidului muramic și prezența acidului N-acetiltalosaminuronic și a L-aminoacizilor, L-lizină, L-alanină, L-acid glutamic, a unui component X și a unui glucid aminat, N-acetilglucozamina (Kandler, 1979). La *Methanococcales*, peretele este alcă-

tuit dintr-un strat unic de subunități proteice dispuse regulat, cu urme de glucozamină. La *Methanomicrobiales*, este format din subunități proteice și lipsit de sacul rigid *(Methanomicrobium)*, acoperite de o teacă externă

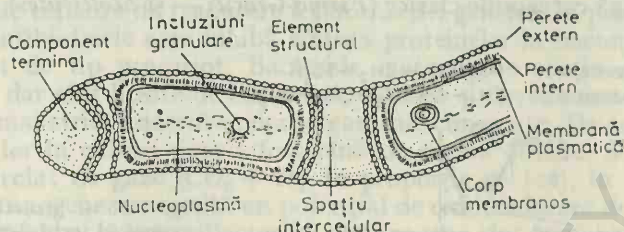


Fig. 113. — *Methanospirillum arbophilicum.* Reprezentarea schematică a unei secțiuni longitudinale (după Zeikus și Henning, 1975).

(Methanospirillum) sau de un înveliș heteropoliglucidic *(Methanosarcina)* (Balch, 1982). Deoarece, peretele celular al metanobacteriilor nu conține mureină, creșterea lor nu este influențată de inhibitorii sintezei acesteia, cum sînt penicilina, cicloserina etc. și nici nu sînt lizate de lizozim. Speciile

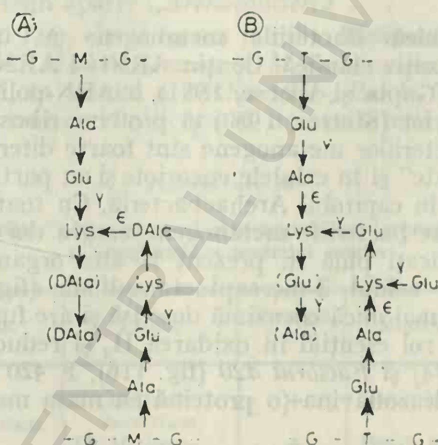
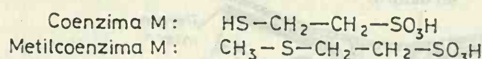


Fig. 114. — **A.** Structura moleculară tipică a mureinei. **B.** Structura pseudomureinei, după König și Kandler, pentru polimerul prezent în peretele celular la *M. thermoautotrophicum*; G—M — acetilglucozamină, M — acid N—acetilmuramic; T — acid N-acetiltalasaminuronic.

care posedă un sacul gros și rigid sînt Gram-pozitive, în timp ce cele lipsite de structura sacciformă rigidă sînt Gram-negative. Aceste date corelate cu relația dintre structura peretelui celular și reacția Gram la bacteriile care conțin peptidoglicani sprijină ideea că reacția Gram depinde în mai mare măsură de proprietățile fizice ale peretelui decît de natura lui chimică (Balch, Fox și Woese, 1979).

Pe baza particularităților peretelui celular al bacteriilor metanogene, Gibbons și Murray (1978) propun crearea unei noi diviziuni *Mendocutes* (gr. *mendos* = nesigur, incert) pentru bacteriile care nu au un perete net peptidoglicanic, pe lîngă categoriile clasice (*Firma-Gracili* — și *Mollicutes*).



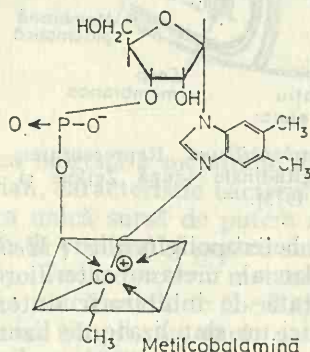


Fig. 115. — Structura coenzimei M (acid 2-mercaptoetan sulfonic) și a metilcobalaminei (după Gottschalk, 1979).

Compoziție chimică. Bacteriile metanogene au unele particularități neobișnuite de compoziție chimică. Conțin ARNt și ARNr 16 S deosebiți de cei tipici bacterieni (Gupta și Woese, 1981), o ARN-polimerază dependentă de ADN de tip eucariot (Stetter, 1980) și proteine ribosomale foarte caracteristice. Lipidele bacteriilor metanogene sînt foarte diferite de cele prezente la bacteriile ,,adevărate'' și în celulele eucariote și au particularitățile generale ale lipidelor descrise în capitolul Archaebacteria. Cu toată diversitatea morfologică, aproape toate bacteriile metanogene conțin doi cofactori unici, de tip special, neidentificați pînă în prezent la alte organisme. *Coenzima M* (HS-CoM), respectiv acidul 2-mercaptoetansulfonic (fig. 115) cu conținut ridicat de S, este cea mai mică coenzimă descrisă și are funcția de transportor al grupării metil, cu rol esențial în oxidarea H_2 și reducerea CO_2 la metan (Taylor și Wolfe, 1974) și *Factorul 420* (fig. 116), F 420 sau CoF, avînd ca grupare cromofor 5-deazoflavina (o proteină cu masa moleculară mică), are

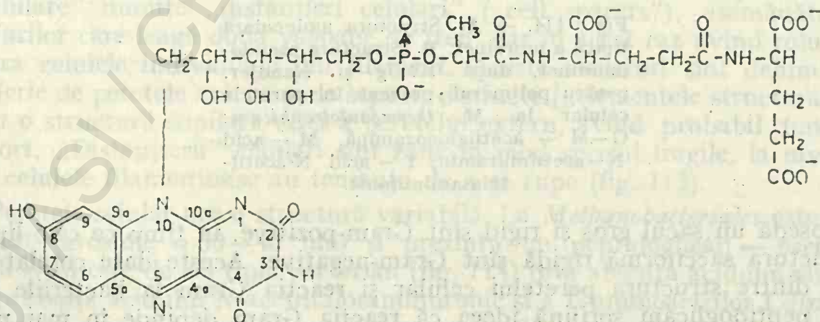


Fig. 116. — Structura chimică a compusului fluorescent F 420, prezent la toate bacteriile metanogene.

rolul de transportor de electroni. În stare oxidată prezintă o fluorescenţă naturală intensă, care permite identificarea uşoară a bacteriilor metanogene, prin microscopie cu fluorescenţă (Mah, 1982).

Sistemele celulare de traducere a informaţiei genetice la proteine nu sînt afectate de antibioticele care inhibă sinteza proteinelor la bacterii, deşi ribosomii lor sînt de tip procariot. Bacteriile metanogene conţin ATP, NAD^+, NADP, CoA, dar sînt lipsite de citocromi, chinone şi ferredoxine (Mah, 1982). Ele sînt cele mai strict anaerobe microorganisme cunoscute. De aceea, izolarea şi cultivarea lor în culturi pure a fost pînă de curînd dificilă. Se dezvoltă în amestec controlat de gaze ($CO_2 + H_2$ în proporţie de 1:4), în medii solide şi lichide. Metanogeneza necesită un potenţial de oxidoreducere de $\sim$ → 200→ →330 mV sau chiar inferior. Bacteriile metanogene sînt mezotermofile (cresc la 35°C în tractusul intestinal, canale, nămol, digestoare) sau termofile (42°C), iar în medii termale şi vulcanice sînt termofile extreme, crescînd la $\sim$ 85°C.

Taxonomie. Datorită particularităţilor lor structurale, biochimice, de metabolism şi ale ARNr 16 S, bacteriile metanogene sînt considerate ca formînd un grup filogenetic coerent, cu totul aparte, la fel de deosebit de bacteriile tipice *(Eubacteria)*, ca şi de toate organismele eucariote, propunîndu-se gruparea lor într-un regn aparte „*Archaebacteria*".

După Bergey (1974), ele ar forma familia *Methanobacteriaceae*, cu genurile *Methanobacterium*, *Methanosarcina* şi *Methanococcus*. Pe baza datelor de structură moleculară, în special a ARNr 16 S, Balch, Woese şi Fox (1979, 1982) au propus revizuirea clasificării şi nomenclaturii lor (tabelul nr. 30).

Tabelul nr. 30

Taxonomia bacteriilor metanogene şi principalele lor caracteristici de structură şi compoziţie a peretelui celular

Ordinul	Familia	Genul	Reacţia Gram	Morfologia	Compoziţia peretelui celular
I. *Methanobacteriales*	I. *Methanobacteriaceae*	I. *Methanobacterium*	+	Bacili lungi	Pseudomureină
		II. *Methanobrevibacter*	+	Bacili scurţi	
II. *Methanococcales*	I. *Methanococcaceae*	*Methanococcus*	—	Coci cu formă regulată sau neregulată	Subunităţi proteice cu urme de glucozamină
III. *Methanomicrobiales*	I. *Methanomicrobiaceae*	I. *Methanomicrobium*	—	Bacili scurţi, încurbaţi	Subunităţi proteice
		II. *Methanogenium*	—	Coci foarte neregulaţi	
	II. *Methanosarcinaceae*	III. *Methanospirillum*	—	Bacili lungi încurbaţi	Subunităţi proteice cu teacă externă
		I. *Methanosarcina*	+	Coci neregulaţi, în pachete	Heteropolizaharide

BIOCHIMIA METANOGENEZEI

În mediile naturale anaerobe, dezasimilarea completă de către bacteriile heterotrofe nemetanogene a compușilor organici complecși (glucide, lipide și proteine) are drept rezultat producerea de CO_2, H_2 și acizi organici vola-

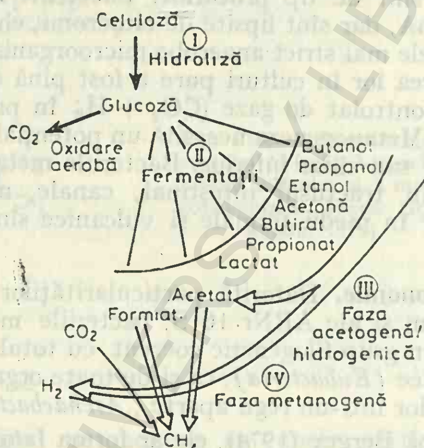
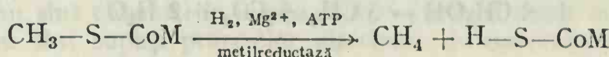


Fig. 117. — Metanogeneza bacteriană consecutivă degradării anaerobe a substanțelor organice (după Vogels, 1979).

tili, dintre care unii servesc direct ca substrat pentru producerea de CH_4 și CO_2. Procesul evoluează în patru etape succesive corespunzînd fazei de hidroliză a polimerilor la monomeri (I), degradării acestora prin procese de fermentație (II) cu formare de butanol, propanol, etanol, acetonă și acizi grași volatili inferiori (butirat, propionat, lactat). În faza acetogenă/hidrogenică (III), acești produși reduși sînt oxidați la acetat, formiat și CO_2, cu formare de H_2, care este greu de detectat, deoarece este rapid și preferențial oxidat de bacteriile metanogene, simultan cu reducerea CO_2 la CH_4, în faza metanogenă (IV) (Vogels, 1979) (fig. 117). Bacteriile metanogene nu pot utiliza compușii organici complecși, dar au proprietatea de a forma metan de la substraturi simple ca formiat, metanol, acetat, mono-, di- și trimetilamină (Mah, Smith și Baresi, 1978; Mah, 1982).

Toate bacteriile metanogene cunoscute pot crește în prezența CO_2 și H_2, dar reacțiile de conversie la CH_4 și produșii intermediari ai reducerii rămîn, probabil, legați de molecule-purtător care sînt numai parțial identificate. Barker (1956, 1972) a propus un mecanism biochimic unificator, după care metanogeneza s-ar realiza de la CO_2 și H_2 prin transferul succesiv pe diferite molecule-purtător, cu formarea unui produs metilat $X—CH_3$, de la care gruparea metil este transferată (prin transmetilare), cu ajutorul unei metiltransferaze, fie direct, fie prin intermediul vitaminei B_{12} (sub formă de $CH_3—B_{12}$), la CoM ($HS—CH_2—CH_2—SO_3H$) activată de o proteină acidă prezentă în celulele bacteriene, cu formare de metil-CoM ($CH_3—S—CH_2—CH_2—SO_3H$). Ulterior, cu ajutorul unei metil reductaze demetilante și în prezența H_2, ATP și Mg^{2+}, de la $CH_3—S—CoM$, probabil precursorul direct, s-ar forma metanul. În acest proces coenzima F 420 are rol important de transportor de electroni. Sensibilitatea extremă a bacteriilor metanogene față de O_2 ar fi legată de oxidarea F 420.

Gunsalus (1976) a propus modificarea schemei lui Barker, indicînd rolul posibil al compuşilor C_1—S—CoM în activarea şi reducerea CO_2 la CH_3—S—CoM (fig. 118). Etapa finală de reducere la metan s-ar desfăşura după reacţia:



$$CH_3—S—CoM \xrightarrow[\text{metilreductază}]{H_2,\ Mg^{2+},\ ATP} CH_4 + H—S—CoM$$

în care rolul ATP este de activator, iar CoM este una dintre „moleculele-purtător necunoscute", al cărui rol a fost postulat de Barker (Taylor şi Wolfe, 1974).

Fig. 118. — Schema reducerii CO_2 la metan, evidenţiind rolul CoM (HS-CoM) în acest proces, după concepţia lui Gunsalus (1976). X—purtător cu structură necunoscută. B_{12s} hidridocobalamină; HS-CoM — coenzima M.

Fig. 119. — Schema generală ⟶ a producerii de metan de la CO, CO_2, formiat, metanol şi acetat (după Doele, 1981).

Unele bacterii metanogene, *Methanobacterium thermoautotrophicum* şi *Methanosarcina barkerii*, folosesc CO ca unică sursă de energie, oxidînd iniţial CO la CO_2 ($CO + H_2O \rightarrow H_2 + CO_2$, pe care îl reduc la metan, după reacţia globală: $4\ CO + 2\ H_2O \rightarrow CH_4 + 3\ CO_2$. Altele au proprietatea de a forma metan de la substraturi organice simple ca formiatul, metanolul şi acetatul (fig. 119). Utilizarea formiatului implică conversia iniţială la CO_2 sub acţiunea formiat dehidrogenazei, urmată de formare de metan, după reacţiile:



$$4\ HCOOH \rightarrow CO_2 + 4\ H_2$$

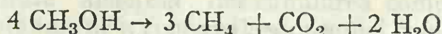


$$CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$



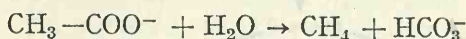
$$4\ HCOOH \rightarrow CH_4 + 3\ CO_2 + 2\ H_2O$$

Metanolul reprezintă un precursor direct care este utilizat de *Methanosarcina barkerii* după reacția globală:



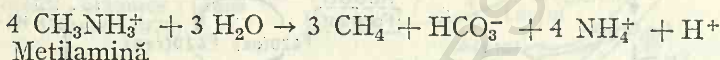
$$4\,CH_3OH \rightarrow 3\,CH_4 + CO_2 + 2\,H_2O$$

Acetatul, care reprezintă un substrat ușor accesibil în sedimentele acvatice, este utilizat de *M. barkerii* și *Methanospirillum hungatii* după reacția:



$$CH_3-COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$$

În sfîrșit, mai multe bacterii metanogene pot utiliza pentru creștere și producere de CH_4, metilaminele (Hipp și colab., 1981; Mah, 1981), după reacțiile:



$$4\,CH_3NH_3^+ + 3\,H_2O \rightarrow 3\,CH_4 + HCO_3^- + 4\,NH_4^+ + H^+$$
Metilamină



$$2(CH_3)_2NH_2^+ + 3\,H_2O \rightarrow 3\,CH_4 + HCO_3^- + 2\,NH_4^+ + H^+$$
Dimetilamină



$$4\,(CH_3)_3NH^+ + 9\,H_2O \rightarrow 9\,CH_4 + 3\,HCO_3^- + 4\,NH_4^+ + 3\,H^+$$
Trimetilamină

Metanogeneza gastrointestinală. Mare parte din metanul produs pe cale biogenă provine din fermentațiile care au loc în tractusul intestinal al animalelor, estimate la $\sim 1-2,\ 2\cdot 10^{14}$ g/an, din care cea mai mare parte este produs în prestomacul rumegătoarelor (Ehhalt, 1975).

Poliglucidele complexe din peretele celulelor vegetale (celuloze, hemiceluloze și pectine), ca și cele de depozit, mult mai solubile (amidon, zaharuri), sînt degradate de enzimele hidrolitice la monoglucide constitutive. Ulterior, pentozele sînt convertite la hexoze, iar hexozele sînt fermentate, urmînd calea glicolitică. Stadiile finale ale metabolismului piruvatului la acizi grași volatili sînt tipice pentru anaerobe. În conversia piruvatului la acetil-CoA se produce H gazos sau formiat, care devin singurele substraturi pentru metanogeneză în rumen (Prins, 1979). Produșii finali ai fermentațiilor microbiene din rumen sînt CH_4, acizi grași volatili, CO_2 și celule microbiene nou formate (fig. 120).

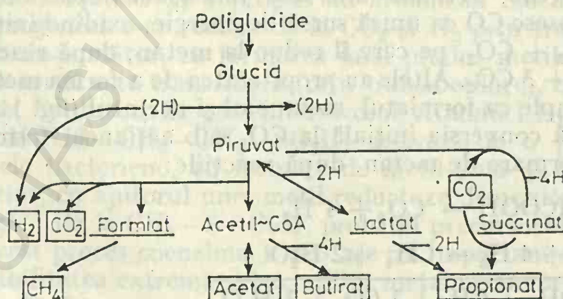


Fig. 120. — Stadiile finale ale metabolismului piruvatului la acizi grași volatili, sub acțiunea microorganismelor din rumen (după Prins, 1979).

TRANSFERUL INTERSPECIFIC DE HIDROGEN

Numeroase observații demonstrează că în ecosistemele anaerobe se acumulează sau sînt eliberați în mediu numai produșii finali ai căilor metabolice, care nu sînt supuși proceselor ulterioare de conversie fermentativă.

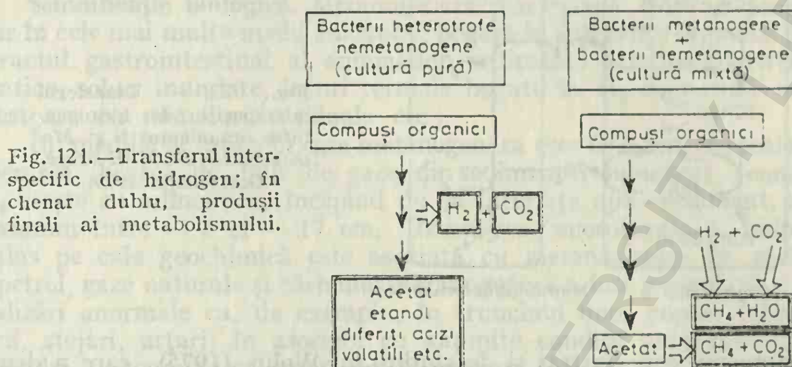


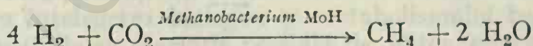
Fig. 121. — Transferul interspecific de hidrogen; în chenar dublu, produșii finali ai metabolismului.

În opoziție cu aceasta, compușii intermediari, în special ai căilor catalizate de complexe multienzimatice, ajung numai rar în cantități detectabile, dedeoarece, de regulă, sînt utilizați ca substrat pe măsură ce sînt produși, în alte reacții enzimatice, în același loc sau în compartimente diferite de cele în care s-au format. În unele cazuri (de exemplu, în rumen), utilizarea produșilor intermediari de către microorganismele comensale este esențială, deoarece acumularea lor ar putea avea efecte inhibitoare chiar asupra celulelor care îi produc.

Transferul interspecific de H_2 (Iannotti și colab., 1973) reprezintă un exemplu de efect beneficial determinat de transferul unidirecțional al unui substrat, de la un microorganism producător la altul utilizator (fig. 121). Procesul a fost descris inițial la *Methanobacterium omelianskii* (Bryant și colab., 1967) la care s-a demonstrat că, în realitate, cultura originală este formată din două tulpini diferite, dintre care una („organismul S") produce H_2, iar cea de-a doua (*Methanobacterium* MoH) oxidează H_2 la metan după reacțiile:



$$2\ CH_3{-}CH_2OH + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{organismul S}} 2\ CH_3{-}COOH + 4H_2$$



$$4\ H_2 + CO_2 \xrightarrow{\textit{Methanobacterium}\ \text{MoH}} CH_4 + 2\ H_2O$$



$$2\ CH_3{-}CH_2OH + CO_2 \xrightarrow{\textit{M. omelianskii}} 2\ H_3{-}COOH + CH_4$$

În cultură pură pe medii cu un alcool utilizabil ca sursă de C, „organismul S" se dezvoltă foarte slab, deoarece hidrogenul acumulat în mediu îi inhibă creșterea. Dezvoltarea abundentă este condiționată de asocierea cu *Metanobacterium MoH*, care convertește H_2 produs la CH_4 (fig. 122). Efectul este bilateral beneficial: bacteriile metanogene sînt aprovizionate continuu cu H_2 necesar pentru creștere; în același timp, ele asigură o presiune parțială joasă a H_2

($3 \cdot 10^{-4}$ atm·($2 \cdot 10^{-7}$ M) în rumenul bovin), grație căreia bacteria S se poate dezvolta abundent, utilizînd și producînd energie de la substraturi ca lactatul și etanolul pe care — în prezența H_2 acumulat în mediu — pentru rațiuni termodinamice nu le pot degrada.

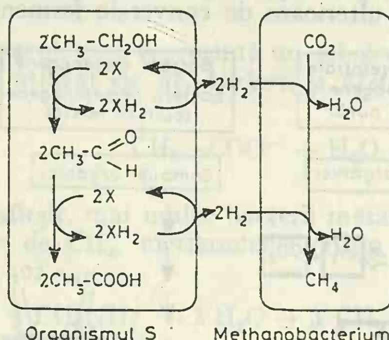


Fig. 122. — Transferul interspecific de hidrogen, între organismul S și *Methanobacterium MoH* (după, Gottschalk, 1979).

Fenomenul este ilustrat și de studiul lui Wolin (1975), care a demonstrat că bacteria din rumen, *Ruminococcus albus*, în cultură pură formează acetat, etanol, H_2 și CO_2. În cultură mixtă cu bacteriile metanogene produce numai acetat și CO_2. Menținînd o tensiune joasă de H_2, bacteriile metanogene permit *R. albus* să devieze cea mai mare parte din puterea reducătoare generată prin glicoliză spre formarea de H_2, pe care îl preiau împreună cu CO_2 utilizîndu-l pentru producerea de energie și creșterea lor. În același timp, *R. albus* formează un surplus de ATP (4 moli ATP per mol de glucoză consumat în loc de 3 moli ATP), ceea ce îi asigură o dezvoltare mai bună (fig. 123).

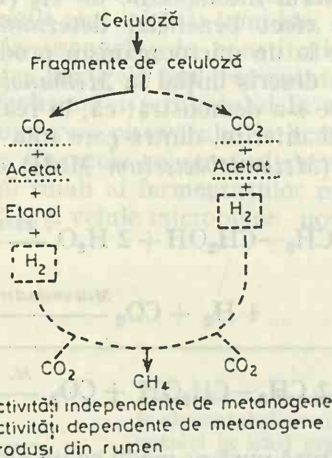


Fig. 123. — Interacțiunea dintre *Ruminococcus albus* și bacteriile metanogene (după Wolin, 1975).

Mecanismul transferului interspecific de H_2 asigură producerea masivă de CH_4 de la CO_2 și H_2 în rumen, ca și în digestoarele anaerobe, deoarece bacteriile metanogene beneficiază de producerea continuă de H_2 de către microorganismele heterotrofe asociate.

Procesul are şi o semnificaţie biologică generală, deoarece asigură posibilitatea membrilor unei asociaţii simbiotice strînse, de a ocupa în natură anumite nişe ecologice speciale.

Mecanismele utilizate de bacteriile metanogene pentru producerea de compuşi celulari de la CO_2 sînt prezentate în capitolul ,,Asimilarea compuşilor C_1 de către microorganisme".

Semnificaţie biologică. Metanogeneza bacteriană este un proces ubicvitar în cele mai multe medii anaerobe, bogate în substanţe organice (rumenul şi tractul gastrointestinal al animalelor, sedimente şi mîlul diferitelor medii acvatice, soluri inundate, lacuri termale bogate în H_2 de natură vulcanică, digestoare cu nămoluri reziduale etc.).

În mediile acvatice în care metanogeneza este frecvent semnalată prin eliberarea bruscă de bule de gaze din sedimentul subiacent, concentraţia CH_4 creşte cu adîncimea, începînd de la interfaţa apă—sediment, ajungînd maximum între — 2 şi — 17 cm. Reducerea microbiană a hidrogenului produs pe cale geochimică este asociată cu metanogeneza în zăcămintele de petrol, gaze naturale şi cărbune. Metanogeneza a fost semnalată şi în unele localizări anormale ca, de exemplu, în trunchiul unor copaci (ulmi, plopi, sălcii, stejari, arţari) în asociere cu anumite condiţii anormale (,,moartea xilemului"). Acumularea metanului la presiuni ridicate este rezultatul multiplicării bacteriei *Methanobacterium arbophilicum* în condiţii de anaerobioză, umiditate mare şi pH alcalin (Zeikus şi Ward, 1974). În habitatele anaerobe, în care au loc descompuneri de substanţe organice, bacteriile metanogene sînt organisme ,,terminale" în lanţul trofic al microorganismelor. Cantitatea de metan produsă anual este apreciată de Prins (1979) la $528-812 \cdot 10^{12}$ g/an, iar sub formă de CH_4 natural fosil la $520 \cdot 10^{12}$ g/an (Prévot, 1980).

Trăsătura remarcabilă a acestor procese de descompunere este că eficienţa lor depinde de interacţiunea unor bacterii metabolic diferite. De aceea, grupul bacteriilor metanogene este foarte util pentru studiul interrelaţiilor trofice în ecosistemele anaerobe. În ultimii ani, bacteriile metanogene au încetat să mai fie un grup misterios de microorganisme puţin studiate (Zeikus, 1977). Ele sînt folosite în practică pentru eliminarea cantităţilor imense de reziduuri organice din agricultură, zootehnie, industrie şi oraşe prin fermentaţie anaerobă în digestoare, furnizînd o sursă energetică neconvenţională reînnoibilă *(biometan)*, paralel cu reducerea volumului reziduurilor, îndepărtarea lor simplă, diminuarea poluării, distrugerea virusurilor şi microorganismelor patogene pentru plante şi animale, obţinerea de fertilizatori pentru agricultură şi produse bogate în proteine pentru hrana animalelor (Macario, 1982). Criza mondială de energie a adus în prim plan interesul pentru înţelegerea biologiei şi metabolismului bacteriilor care produc gaze combustibile ca o soluţie posibilă de viitor pentru furnizarea unor combustibili neconvenţionali de la CO_2 şi H_2 utilizînd, în special, gazele reziduale din industrie.

FIXAREA BIOLOGICĂ A AZOTULUI

(Pl. 16—18)

Reducerea enzimatică a N_2 atmosferic la NH_3 este un proces cu o mare importanță agricolă și ecologică, deoarece reprezintă cea mai importantă sursă de N metabolizabil necesar organismelor vii. Productivitatea solului este corelată cu bogăția în N, într-o formă chimică potrivită utilizării de către plante. Prezent în atmosferă în cantitate mare (79%), ca un gaz diatomic (N_2), aproape inert, inaccesibil organismelor vii și pierdut din sol prin recoltarea plantelor și denitrificare, N este readus în sol pentru refacerea rezervelor necesare menținerii vieții plantelor prin fixare pe cale biologică (~ 75%, respectiv —150 milioane tone/an) prin fixare chimică industrială și formare de oxizi de N în atmosferă (Brill, 1980).

MICROORGANISMELE FIXATOARE DE N_2

Proprietatea de fixare biologică a N_2 condiționată de prezența unui sistem enzimatic specific — nitrogenaza — este limitată în mod exclusiv la cîteva genuri de bacterii:

A. **Bacterii heterotrofe libere**: a) aerobe: *Azotobacter, Azomonas, Beijerinçkia, Derxia, Methylococcus, Methylosinus, Spirillum* etc.; b) facultativ anaerobe: *Bacillus, Klebsiella* etc.; c) anaerobe: *Clostridium, Desulfovibrio* etc.

B. **Bacterii chemoautotrofe**: *Thiobacillus*.

C. **Bacterii fototrofe**: a) *Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium, Rhodospirillum, Chlorobium, Chromatium* etc.; b) Cianobacterii libere: filamentoase cu heterochiști: *Anabaena, Chlorogloea, Cylindrospermum, Fischerella, Nostoc* etc.; filamentoase fără heterochiști: *Lyngbya, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema* etc.; unicelulare: *Gloeocapsa*.

D. **Bacterii simbiotice care produc nodozități**: *Rhizobium* — leguminoase; *Rhizobium* — neleguminoase *(Trema cannabina)*; actinomicete — angiosperme neleguminoase *(Alnus, Myrica, Hippophaë* etc.); cianobacterii *(Nostoc, Anabaena)* — *Cycas, Bowenia* etc.

E. **Cianobacterii simbiotice cu alte organisme eucariote**: *Nostoc* — fungi (licheni) gen. *Peltigera, Collenia; Nostoc* — hepatice *(Anthocera, Blasia* etc.); *Anabaena* — *Pteridophyta (Azolla)*; *Nostoc* — angiosperme *(Gunnera)*.

F. **Simbioze asociative**: *Paspalum — Azotobacter paspali; Digitaria decumbens — Spirillum lipoferum* (bacteriile cresc pe/ și în rădăcini fără să producă nodozități).

G. **Simbioze cu bacterii celulozolitice** (la termite, rumegătoare etc.).

Activitatea fixatoare de N_2 nu a fost evidențiată pînă în prezent la nici un organism eucariot. La plantele leguminoase ~32% din C total fixat prin fotosinteză este translocat în nodozități. Din acesta, — 55% este utilizat pentru a furniza energia necesară pentru creșterea nodozității și fixarea N_2. Este deci probabil că majoritatea plantelor nu pot acoperi nevoile energetice ale procesului de fixare a N_2.

Biologia, biochimia, genetica și reglarea fixării biologice a N_2 sînt foarte complicate și în mare parte încă neelucidate*).

BIOCHIMIA FIXĂRII BIOLOGICE A N_2

Nitrogenaza (N_2aza) este molecula-cheie, universal folosită de organismele fixatoare de N_2. Este un sistem enzimatic alcătuit din două proteide: *azoferredoxina* și *molibdoferredoxina*, separat inactive, prezente în raport de 2:1.

Componentul I (Molibdoferredoxina) este o moleculă mare (M 220 000—250 000 dal) alcătuită din patru subunități (cîte două copii a două subunități diferite sau $\alpha 2$ $\beta 2$), fiecare formată dintr-un lanț unic de aminoacizi, 28—34 atomi de Fe, 26—28 atomi de S numiți labili, deoarece sînt eliberați sub formă de H_2S în mediu acid. Componentul I funcționează asociat cu o moleculă mică, numită cofactor, care face parte din situsul activ al enzimei și conține 2 atomi de Mo și cîțiva atomi de Fe. Are rol în legarea substratului și reducerea N_2 (fig. 124).

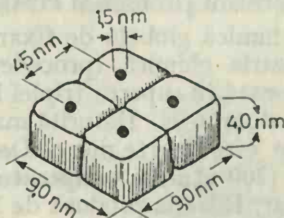


Fig. 124. — Modelul structurii cuaternare a proteinei MoFe, cu așezarea în tetradă a subunităților componente (protomere). Reconstituire după imaginea electronomicroscopică a enzimei cristalizate (după Stasny, 1974).

Componentul II (azoferredoxina sau *nitrogenreductaza)* are g.m. 55 000 — 65 000 dal și este alcătuită din două subunități proteice, 4 atomi de Fe și 4--11 atomi de S labili în mediu acid (Hageman și Burris, 1978).

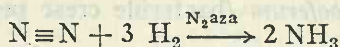
Cei doi componenți, indiferent de proveniența lor, par chimic și funcțional omologi. Detroy (1968) a preparat o N_2ază „hibridă", activă, punînd în amestec componentul I de la *Klebsiella pneumoniae* și componentul II de la *Azotobacter chroococcum*.

Proprietățile N_2azei.

— În prezența Mg^{2+} și a unui agent reducător catalizează o reacție de degajare de H, activată de ATP. În aceste condiții, reduce orice fel de mole-

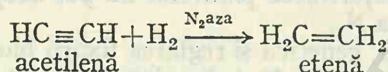
*) Aceste aspecte vor fi tratate în detaliu în volumul IV.

cule cu triplă legătură, ca N≡N după reacția:



$$N \equiv N + 3\ H_2 \xrightarrow{N_2aza} 2\ NH_3$$

Pe acest principiu se bazează *testul de reducere a acetilenei la etenă* $H_2C{=}CH_2$ (Schöllhorn și Burris, 1965), grație căruia activitatea nitrogenazică poate fi determinată prin cromatografie în fază gazoasă cu o precizie de o mie de ori mai mare decît prin dozarea N total sau prin încorporarea ^{15}N (Mac Neil, 1978), după reacția:



$$\underset{\text{acetilenă}}{HC \equiv CH} + H_2 \xrightarrow{N_2aza} \underset{\text{etenă}}{H_2C{=}CH_2}$$

N_2aza are o foarte mare sensibilitate față de O_2 de care este inactivată imediat. De aceea, este activă fie în anaerobioză strictă, fie în prezența unui mecanism de protecție față de O_2.

— Necesită, pentru a funcționa, o foarte mare cantitate de ATP (6—24 ATP pentru fiecare N_2 fixat).

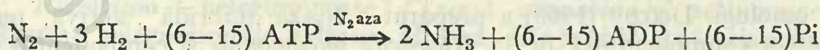
— Este puțin eficientă comparativ cu alte enzime și formează numai o mică parte (~ 1 %) din proteina celulară totală.

— Limitarea prezenței sale la un număr restrîns de bacterii și absența totală din celulele eucariote sînt datorate, probabil, necesităților ridicate de energie, cantității mari de enzimă care trebuie sintetizată și labilității față de O_2 (Mac Neil și colab., 1978).

— Este totdeauna asociată cu o hidrogenază capabilă să mărească eficiența fixării N_2, deoarece, pe de o parte, furnizează putere reducătoare și asigură producerea de ATP-dependentă de H_2 (Dixon, 1972; Ruiz-Arguezo și colab., 1979), iar, pe de altă parte, mărește eficiența proceselor de excludere a O_2, cu rol inactivant (Robson și Postgate, 1980).

Reacția chimică globală de fixare a N_2 este aceeași indiferent dacă se obține în industria chimică (procedeul Haber-Bosch, 1913) sau în celula bacteriană și constă în ruperea triplei legături din molecula de N_2 și legarea a 3 H de fiecare atom de N. Datorită marii stabilități a N≡N, energia necesară pentru activare este foarte mare. De aceea, în procedeul chimic reacția are loc la presiuni (200 atm) și temperaturi ridicate (550°C), iar H este furnizat ca gaz molecular. Reacția produsă de N_2ază are loc la temperatura camerei și de aceea necesită putere reducătoare și consum de ATP.

Atît *in vivo*, cît și *in vitro* (preparate de N_2ază acelulare), în funcție de condiții, reducerea fiecărei molecule de N_2 este asociată cu consumul a 6—15 ATP, iar după Brill (1980) chiar 21—25 ATP, după reacția:



$$N_2 + 3\ H_2 + (6{-}15)\ ATP \xrightarrow{N_2aza} 2\ NH_3 + (6{-}15)\ ADP + (6{-}15)Pi$$

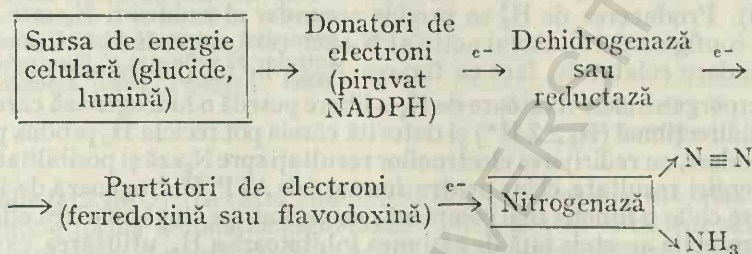
Sursele de *putere reducătoare* sînt reprezentate de *ferredoxina redusă* sau de *flavodoxină*.

Ferredoxinele sînt purtători de electroni (proteine cu FeS) capabile să sufere oxidări și reduceri reversibile. Au un potențial redox scăzut (~0,40 v).

Flavodoxinele sînt flavoproteine (conţin FMN) prezente numai în celulele cultivate pe medii cu foarte puţin Fe, avînd, de asemenea, funcţia de purtător de electroni şi un potenţial redox scăzut. Izolate iniţial de la *Clostridiumpasteurianum*, înlocuiesc ferredoxinele într-un număr mare de reacţii *in vitro* şi probabil şi *in vivo*, în celule lipsite de Fe.

Forma redusă a ferredoxinei este generată de reacţiile piruvat-ferredoxin oxireductazei sau ale hidrogenazei (anaerobioză strictă) prin fotofosforilare neciclică (la cianobacterii), prin transport invers de electroni (la bacteriile fototrofe) sau cu ajutorul NADH sau NADPH ca donatori de H la bacteriile aerobe.

Schema generală a căilor de fixare a N_2 este, după Beneman şi Valentine (1972), următoarea:



Ferredoxina sau flavodoxina transferă electronii proveniţi de la glucide iniţial la componentul II (azoferredoxina), care reacţionează cu ATP şi cedează electronii componentului I, la nivelul căruia are loc reducerea efectivă a N_2 la NH_3. Pe seama consumului de energie rezultată (hidroliza ATP), potenţialul grupărilor redox ale N_2azei este scăzut în continuare şi, în final, se formează o molibdoferredoxină superredusă, care leagă N_2 şi îl reduce treptat la NH_3. Legarea propriu-zisă a N_2 s-ar realiza la nivelul atomilor de Mo, dar detaliile formării de NH_3 nu sînt cunoscute, deoarece pînă în prezent nu a fost

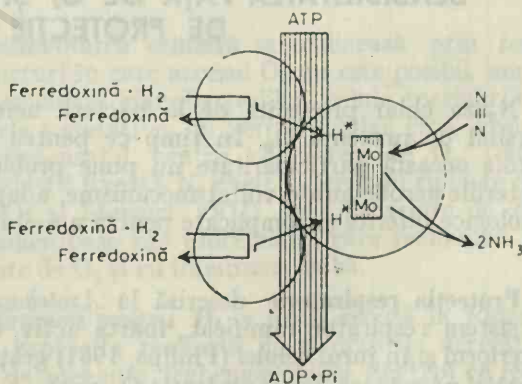


Fig. 125. — Reducerea N_2 la NH_3 catalizată de nitrogenază. Cercurile mici simbolizează azoferredoxina, iar cele mari molibdoferredoxina. H*Mo — molibdoferredoxină hiperredusă (după Gottschalk, 1979).

descoperită nici o substanţă intermediară între N şi NH_3 (fig. 125). Este probabil că, toate stările intermediare ar rămîne legate de N_2ază. După unele ipoteze, ruperea triplei legături s-ar face treptat, asociată cu legarea cîte

unui atom de H de fiecare atom de N, astfel că, înainte ca legătura triplă dintre atomii de N să fie desfăcută complet ar exista cel puțin o stare intermediară, diimida (HN=NH).

Producerea de H_2 dependentă de nitrogenază. Reducerea N_2 la NH_4^+ este însoțită totdeauna de formarea de H_2, dependentă de activitatea N_2azei, deoarece o parte din electronii furnizați de substratul reducător nu sînt destinați reducerii N_2, ci formează H_2 prin reducerea H^+ din citosol, după reacția $2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2$. Producerea de H_2 apare ca o expresie a competiției pentru electroni între situsul activ al N_2azei și protonii (H^+) din citosol, care amplifică mult consumul energetic, și așa foarte ridicat, al fixării N_2 (producerea de H_2 sustrage fluxului energetic ~4 molecule de ATP pentru fiecare moleculă de N_2 fixată). Producerea de H_2 ca produs secundar al reducerii N_2 este o consecință a configurației situsului activ al N_2azei, care, neputînd să elimine reacțiile secundare colaterale, face ca fixarea N_2 să fie un proces energointensiv.

Microorganismele fixatoare de N_2—libere posedă o hidrogenază care poate acționa bidirecțional ($H_2 \rightleftarrows 2H^+$) și datorită căreia pot recicla H_2 produs prin reacții de oxidare, cu redirijarea electronilor rezultați spre N_2ază și posibilitatea utilizării energiei rezultate chiar pentru formare de ATP. Hidrogenaza de la *Azotobacter* are chiar o funcție mai complexă, asigurînd, pe lîngă mărirea eficienței N_2azei, protecția acesteia față de acțiunea inhibitoare a H_2, utilizarea excesului de O_2 și menținerea condițiilor de anaerobioză la nivelul situsului activ al enzimei. În schimb, microorganismele fixatoare de N_2 producătoare de nodozități (la leguminoase, ca și la neleguminoase), în majoritate lipsite de hidrogenaze, sînt incapabile să recupereze H_2 format. Ele pierd ~ 40—60% din fluxul de electroni transferați la H_2ază prin formare de H_2 (Schubert și colab., 1976) care nu poate fi recuperat și reciclat, ceea ce constituie un factor limitant al fixării, în special cînd aportul produselor de fotosinteză este diminuat.

SENSIBILITATEA FAȚĂ DE O_2 ȘI MECANISMELE DE PROTECȚIE

N_2aza chiar provenită de la bacterii aerobe este inactivată rapid și ireversibil de prezența O_2. În timp ce pentru bacteriile strict anaerobe și fototrofe această particularitate nu pune probleme speciale, cianobacteriile și bacteriile aerobe au dezvoltat mecanisme, adaptări și stratageme anatomice și fiziologice diferite și complicate pentru a evita accesul O_2 (Evans și Barber, 1977).

Protecția respiratorie descrisă la *Azotobacter* se realizează cu ajutorul unui sistem respirator ramificat, foarte activ, care reduce concentrația O_2 în interiorul și în jurul celulei (Philips, 1961) grație capacității de a crește rata respirației pe măsură ce concentrația O_2 crește.

Protecția conformațională și compartimentarea subcelulară descrisă la *Az. chroococcum* se bazează pe observația că, în cazul creșterii bruște a concentrației de O_2, activitatea N_2azei este întreruptă, pentru ca să reapară cînd

concentrația O_2 scade (fig. 126). Această comportare s-ar datora faptului că N_2aza de *Azotobacter* s-ar găsi atît în celule, cît și în extractele brute, inclusă în particule subcelulare, bogate în material membranar, care le face relativ

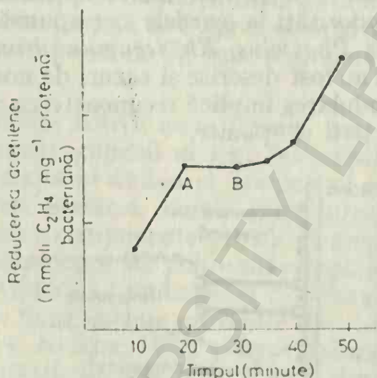


Fig. 126. — Influența aerației asupra activității nitrogenazei la *Azotobacter chroococcum*. Cultura de *A. chrococcum* este agitată ușor (de 75 de ori cîte 1,5 cm/minut), în prezența a 0,1 atm. O_2 în N_2 cu 0,04 atm. acetilenă. Se înregistrează formarea etenei. Agitarea este intensificată în A și revine la valoarea inițială în B. De notat, întîrzierea observată în revenirea la valoarea maximă (după Postgate, 1982).

insensibile față de O_2. În cazul unui stress de O_2, *Azotobacter* ar putea converti N_2aza într-o formă nefuncțională, stabilă la aer, în care situsurile sensibile la O_2 ar fi protejate. Această modificare s-ar putea realiza fie printr-o modificare conformațională, fie prin complexarea enzimei cu anumite proteine FeS, ca, de exemplu, proteina Shethna (proteina FeS II). Acest gen de protecție conformațională ar fi operantă cînd stressul de O_2 este atît de mare, încît protecția respiratorie este depășită.

Formarea unor structuri protectoare este întîlnită la *Azotobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia* etc., care produc colonii gumoase, în care capsula abundent dezvoltată protejează N_2aza de O_2, încetinind difuzia acestuia la situsurile sensibile (Postgate, 1971; Hill, 1972). Aceste structuri diminuă și accesul N_2, dar acest proces este nesemnificativ deoarece nevoia de N_2 este mică.

Diferențierea și compartimentarea celulară se realizează prin restrîngerea localizării N_2azei în structuri în care accesul O_2 nu este posibil sau este foarte slab, așa cum sînt heterochiștii cianobacteriilor, celule specializate, cu dimensiuni mai mari decît cele vegetative, cu perete celular gros, lipsite de sistemul fotosintetic II, indispensabil pentru eliberarea de O_2. Datorită acestor particularități, heterochiștii fixează N_2 chiar la tensiuni ridicate de O_2 și cu iluminare intensă (Tel-Or și Stewart, 1977), spre deosebire de cianobacteriile fixatoare de N_2 filamentoase sau unicelulare, care realizează acest proces numai la tensiuni scăzute de O_2 și cu iluminare slabă.

Prezența unor sisteme tampon pentru O_2 a fost descrisă la *Rhizobium* care în nodozități, pe lîngă protecția realizată de structurile derivate din peretele celular, beneficiază de prezența leghemoglobinei (legHb) ce recuperează cu mare afinitate O_2, servește ca transportor specializat și îl cedează bacteroizilor în cantitățile necesare pentru respirație, dar insuficiente pentru a leza N_2aza.

FIXAREA SIMBIOTICĂ A N_2

Este cel mai bine studiată în cazul simbiozei dintre *Rhizobium* și plantele leguminoase*). Cele mai multe specii de *Rhizobium* infectează specific și produc nodozități la gazdele corespunzătoare (*Rh. trifolii* la *Trifolium*, *Rh. phaseoli* la *Phaseolus*, *Rh. leguminosarum* la *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* și *Lens* etc.), deși au fost descrise și cazuri de nodulare cu gazde „incorecte" (Hepper, 1978). Nodularea implică recunoașterea mutuală, cel mai adesea foarte precisă între bacterii și plante.

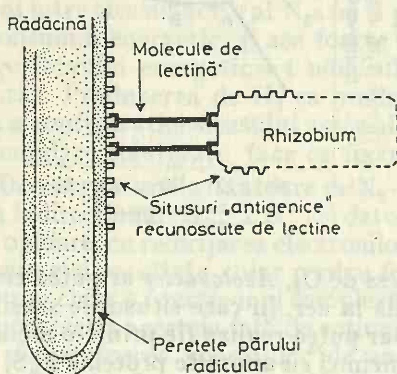


Fig. 127. — Rolul moleculelor de lectine în fixarea specifică a bacteriilor din genul *Rhizobium*, numai pe rădăcinile plantei-gazdă corespunzătoare. Schema elaborată de Dazzo pentru sistemul trifoi — *R. trifolii* evidențiază caracterul bifuncțional al lectinelor, care recunosc și leagă situsurile „antigenice" de pe suprafața părului radicular cu cele situate pe suprafața bacteriei (după Postgate, 1982).

Un rol important în determinarea spectrului de specificitate de gazde îl au lectinele vegetale. Lectinele izolate de la o plantă leagă preferențial tulpinile de *Rhizobium*, care infectează normal plantele respective (Bhuvaneswari și colab., 1977). Legarea are loc la nivelul perilor radiculari sau al unor leziuni, care apar de regulă la nivelul emergenței rădăcinilor laterale (Beringer, 1980). Rădăcinile de trifoi și polizaharidul capsular de *Rh. trifolii* au un determinant antigenic comun, care se leagă specific de o lectină de trifoi „trifoliina" (fig. 127) care acționează ca o punte biochimică între cele două zone de similaritate antigenică (Dazzo și Hubbel, 1975, 1978).

Nu se cunoaște exact natura reacției de legare a lectinelor și nici funcția lor: inițiatori ai infecției sau stimuli care declanșează dezvoltarea nodulilor. În perii radiculari, bacteriile sînt închise ca într-un tub — *filamentul infecțios* — înconjurat de un material pectic și celulozic dezvoltat în continuarea peretelui celular, care înaintează, se ramifică, străbate numeroase celule, determinînd stimularea diviziunii celulare în regiunea cortexului radicular și formarea de nodozități, ca un proces controlat și ca o structură diferențială. Nodulul apare ca un organ vegetal, înalt dezvoltat, care funcționează ca un sistem aerob fixator de N_2, în care bacteriile normale evoluează spre stadiul de *bacteroizi*, forme fixatoare de N_2.

Bacteroizii sînt localizați în „pachete" individuale de 3—4 celule înconjurate de o membrană de origine vegetală și de un citosol bogat în proteine și legHb (Tubb, 1974; Bergersen, 1974). Ei pot reprezenta pînă la 30% din greutatea nodulului (Evans, 1977).

*) Aspectele structurale, biologice, ecologice etc. vor fi descrise în volumul V, capitolele *Relații microorganisme — plante* și *Microbiologia solului*.

Rhizobium produce acid indolacetic (Dullaart, 1970), mici cantități de citokinine (Phillips și Torrey, 1972), hormoni vegetali, precum și mici cantități de poligalacturonaze, care favorizează infecția și creșterea filamentului infecțios în rădăcini. Planta asigură pe lîngă protecția față de O_2 prin compartimentare, aprovizionarea bacteriilor cu carbohidrați (sursă de C), apă și globina necesară pentru sinteza legHb.

Rolul leghemoglobinei. Nodozitățile active au o culoare roz, datorită legHb, pigment roșu (similar mioglobinei), capabil să lege reversibil, dar cu mare afinitate, O_2. Ea este un produs major al simbiozei, rezultat al cooperării între celula vegetală care face sinteza globinei, numai după infectarea cu *Rhizobium*, și bacteroizii ce asigură sinteza componentei prostetice hem. ARNm pentru globină a fost evidențiat ca fiind legat de polisomii citoplasmatici a celulei vegetale (Verma și Nash, 1974; Sidloi-Lumbroso și Schulman, 1978). Sinteza grupului hem este asigurată de două enzime provenite din bacteroizi: acid δ-aminolevulinic sintetaza (Nadler și Avissar, 1977) și ferocetolaza (Porra, 1975,). LegHb poate ajunge în nodozitățile de soia pînă la 40% din proteina solubilă totală a nodulului (Nash și Schulman, 1976), ceea ce corespunde la o concentrație intracelulară de 0,8 mM (Bergmersen, 1979). Această concentrație ridicată este determinată de faptul că în celulele infectate, din cauze necunoscute, are loc duplicarea genelor care asigură sinteza legHb.

LegHb fixează o mare cantitate de O_2 și participă printr-un proces de difuzie facilitată în transferul acestuia de la exteriorul nodozităților la bacteroizi ca oxilegHb. Datorită unei capacități foarte slabe de disociere a O_2 liber, acesta este menținut la nivelul bacteroizilor într-o concentrație foarte scăzută, în limite care permit menținerea metabolismului oxidativ și producerea de ATP în lanțul respirator bacterian, dar în același timp suficient de mică pentru a asigura protejarea N_2azei de inactivare (Wittenberg și colab., 1974).

N_2 redus la NH_3 sub acțiunea N_2azei este preluat de *glutamin sintetaza* prezentă în citosolul vegetal. Gruparea amino este transferată fie la aspartat, cu formare de asparagină, care este eliminată din nodul prin sistemul de transport radicular, fie transferată la α-cetoglutarat (produs pe calea ciclului Krebs de la glucoză) pentru a forma glutamat (fig. 128). Asparagina, glutamina și glutamatul reprezintă surse importante de N_2 pentru plante (fig. 129).

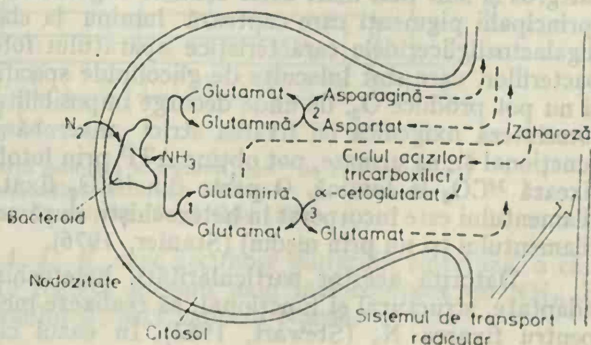


Fig. 128. — „Calea azotului" din atmosferă pînă la sistemul radicular de transport al plantei. Cheia enzimelor: 1. Glutamin-sintetază. 2. Glutamin-aspartat amidotransferază. 3. Glutamin-α-cetoglutarat amidotransferază (după Miflin și Lea, 1976).

Fig. 129. — Fixarea simbiotică a azotului. Reprezentarea schematică a activităților metabolice ale bacteroizilor și relațiile lor cu procesele metabolice proprii nodozităților de la leguminoase (după Evans, 1977).

FIXAREA N_2 DE CĂTRE CIANOBACTERII

Se realizează la nivelul heterochiștilor, celule cu o diferențiere ireversibilă, incapabile de diviziune și germinare, care apar la cianobacteriile filamentoase, la anumite intervale, de-a lungul unui lanț de celule vegetative, cînd culturile sînt lipsite de o altă sursă de N, diferită de N_2. Heterochiștii au peretele celular gros și sînt mai mari decît celulele vegetative. Nu conțin ficobiliproteine (principalii pigmenți care captează lumina la cianobacterii) și nici mono- și digalactozilgliceridele caracteristice aparatului fotosintetic normal al cianobacteriilor, care sînt înlocuite de glicolipide specifice. Nu au fotosistemul II și nu pot produce O_2, de unde decurge imposibilitatea unei interferențe între fotosinteză oxigenică cu fixarea strict anaerobă a N_2. Au fotosistemul I funcțional și, ca urmare, pot obține ATP prin fotofosforilare. Heterochiștii nu fixează $^{14}CO_2$ la lumină. O parte din $^{14}CO_2$ fixat de celulele vegetative ale filamentului este încorporat în heterochiști, după ce este transferat de-a lungul filamentului (și nu prin mediu) (Stanier, 1976).

Datorită acestor particularități, heterochiștii sînt celule specializate, adaptate, structural și funcțional, să realizeze mediul celular anaerob necesar pentru fixarea N_2 (Stewart, 1962). În cazul cianobacteriilor filamentoase există o interdependență nutrițională foarte strictă între celulele care compun

filamentul şi care asigură funcţionarea simultană a fotosintezei aerobe (în celulele vegetative) şi a fixării anaerobe a N_2 în heterochişti. Celulele vegetative adiacente heterochiştilor le furnizează puterea reducătoare necesară pentru fixarea N_2 sub forma substanţelor organice donatoare de electroni, iar heterochiştii le cedează NH_3 fixat, necesar creşterii celulelor vegetative (fig. 130) (după Gottschalk, 1979).

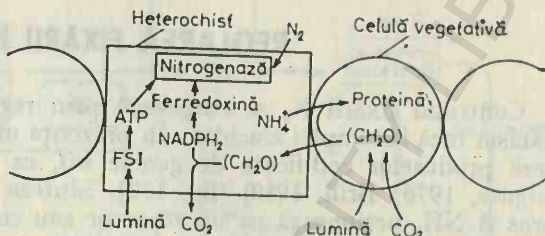


Fig. 130. — Biochimia fixării azotului în heterochişti. Celulele vegetative adiacente furnizează metaboliţi pentru producerea de NADPH. Sinteza ATP are loc în heterochişti prin fotofosforilare. FS I — fotosistemul I (după Gottschalk, 1979).

Există cianobacterii fixatoare de N_2 fără heterochişti şi fără sisteme protectoare evidente. Dintre acestea, *Gloeocapsa* fixează N_2 numai la tensiuni parţiale foarte joase şi cu iluminare slabă, în timp ce *Plectonema* sintetizează N_2ază la lumină, în anaerobioză strictă, dar nu poate exprima informaţia genetică respectivă în aerobioză. Cianobacteriile cu heterochişti au, pe lîngă capacitatea de a sintetiza N_2aza, şi pe aceea de a o menţine funcţională în aerobioză.

GENETICA FIXĂRII N_2

Determinismul genetic al fixării biologice a N_2 nu este încă elucidat. La *K. pneumoniae*, genele formează operonul *„nif"* („nitrogen fixation"), care cuprinde 17 cistroni (~ 24 kb) şi este situat pe cromosomul bacterian lîngă genele *his* (fig. 131) (Brill, 1980; Roberts, Mac Neil şi Brill, 1981). El

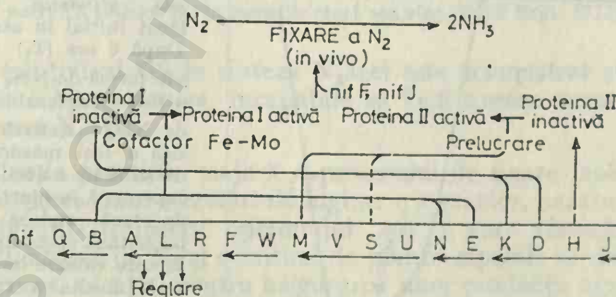


Fig. 131. — Harta genetică a regiunii „nif" de la *Klebsiella pneumoniae*, prezentînd ordinea, unităţile de transcriere şi funcţia genelor (după Brill, 1980).

include genele de reglare *A, L, R*, care recunosc glutamin sintetaza, a cărei sinteză, la rîndul său, este reglată într-un mod mai complex de NH_3. Ea reglează transcrierea operonului şi, deci, sinteza N_2azei.

La bacteriile simbiotice, capacitatea de nodulare (infecțiozitatea) este conferită de gene plasmidiale, iar operonul „*nif*" este situat pe o plasmidă diferită. După conjugarea cu *Rh. leguminosarum* (♂), tulpinile de *Rh. trifolii* sau *Rh. phaseoli* receptoare (♀) dobîndesc, odată cu plasmida „*nif*", capacitatea de a produce nodozități la mazăre (Johnston, 1978).

REGLAREA FIXĂRII N_2

Controlul fixării N_2 se realizează prin reglarea genelor *nif*, printr-un mecanism încă incomplet elucidat. În prezența unui exces de NH_4^+ în mediu, sinteza produselor codificate de genele *nif*, ca și activitatea lor încetează (Postgate, 1976; Brill, 1980) (fig. 132). Sinteza N_2azei este sub un control riguros și NH_3 acționează ca un represor sau corepresor, care blochează nu numai propria sa sinteză, ci și alte activități, ca, de exemplu, propria sa cale de asimilare. Diferite surse de N din mediu represează sinteza N_2azei și, în general, cu cît sursa de N este mai bună pentru creștere, cu atît gradul de represie este mai mare (Roberts și Brill, 1978).

Un rol-cheie în reglarea fixării N_2 are *glutamin sintetaza*, una dintre enzimele esențiale pentru utilizarea NH_3, prin combinarea lui cu glutamatul și formare de glutamină și, pornind de la aceasta, a altor aminoacizi. Glutamin sintetaza (GS), care poate fi prezentă în formă enzimatic activă și inactivă, acționează și ca moleculă de reglare.

În prezența unor concentrații mici de NH_3 este produsă în cantitate mare forma sa activă, dezadenililată, care acționează ca inductor pozitiv al sintezei N_2azei (genele *nif* sînt transcrise numai dacă GS este prezentă în concentrații mari în celule — Tubb, 1974). Sub forma sistemului glutamin sintetază—glutamat sintetază, ea acționează ca factor de încorporare a NH_3

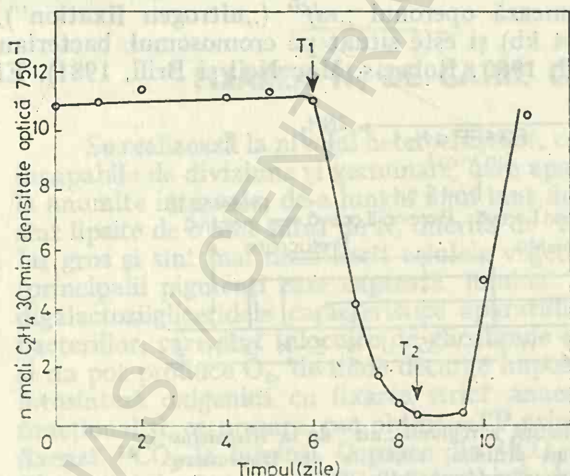


Fig. 132. — Efectul NH_3 asupra activității nitrogenazei la *Anabaena cylindrica*. Cultivarea s-a făcut inițial în atmosferă de N_2. După 6 ore (T_1) s-a adăugat N, sub formă de NH_4^+. La T_2, cultura a fost transferată în mediu lipsit de NH_4^+. Activitatea nitrogenazică a fost măsurată prin testul de reducere a acetilenei la etenă și exprimată în funcție de cantitatea de etenă produsă de o biomasă bacteriană standard în 30 minute. Fiecare valoare înregistrată reprezintă media a trei determinări (după Stewart, 1977).

în compuși organici. În schimb, în prezența unor concentrații mari de NH_3, GS este represată: datorită, probabil, nevoilor mari de energie, microorganismele nu fixează N_2 decît cînd N fixat lipsește din mediu. Pe de altă parte,

prezenţa aminoacizilor în mediu în concentraţie mare determină inhibarea prin feedback a GS, în aşa fel încît intensitatea activităţii acestei enzime este o măsură şi un test al nevoilor celulare de N fixat (fig. 133). Prezenţa GS active stimulează fixarea N_2 şi reflectă o deficienţă relativă în aminoacizi.

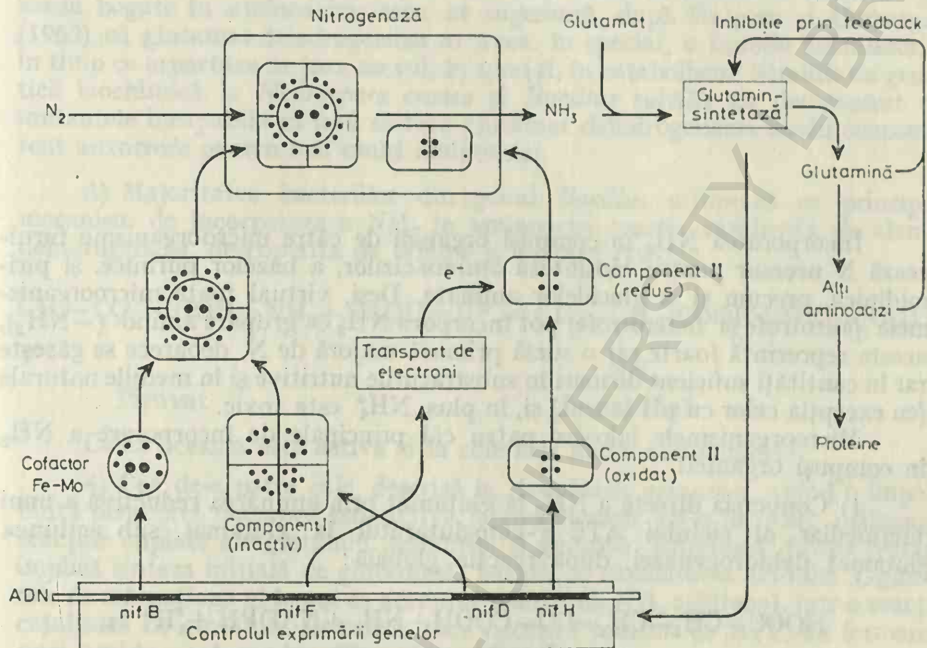


Fig. 133. — Schema controlului fixării biologice a azotului, prin intermediul enzimei glutamin sintetaza. NH_3 rezultat din fixarea N_2 se combină cu glutamatul, într-o reacţie catalizată de glutamin sintetază, pentru a forma glutamină, de la care se formează alţi aminoacizi. Concentraţiile mari de aminoacizi inhibă glutamin sintetaza a cărei activitate este o măsură a cerinţelor celulelor de N_2 fixat. Glutamin sintetaza reglează, probabil, rata fixării, prin comutarea alternativă a genelor *nif* în poziţiile start sau stop (după Brill, 1977).

Rolul esenţial al GS în sinteza N_2azei este demonstrat şi de faptul că mutantele de *K. pneumoniae*, incapabile să facă sinteza acestei enzime, nu sintetizează nici N_2ază.

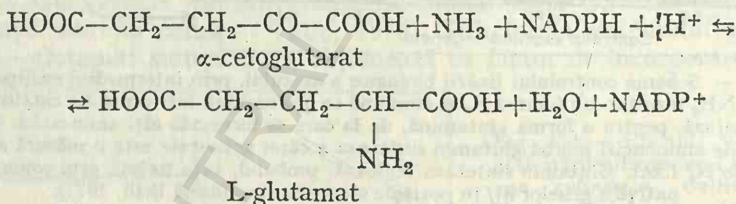
Semnificaţia practică majoră a procesului de fixare biologică a N_2 a determinat iniţierea unor cercetări de inginerie a genelor, bazate pe tehnologia ADN recombinant (transferul operonului *„nif”)*, care vizează obţinerea de noi bacterii fixatoare de N_2 şi eventual de plante capabile să desfăşoare autonom acest proces, esenţial pentru asigurarea unor producţii agricole şi silvice ridicate.

ASIMILAREA AMONIACULUI ÎN COMPUŞI ORGANICI

Încorporarea NH_3 în compuşi organici de către microorganisme furnizează N necesar pentru biosinteza aminoacizilor, a bazelor purinice, şi pirimidinice, precum şi a glucidelor aminate. Deşi, virtual toate microorganismele (autotrofe şi heterotrofe) pot încorpora NH_3 ca grupare amino- ($-NH_2$), acesta reprezintă foarte rar o sursă primară majoră de N, deoarece se găseşte rar în cantităţi suficient de mari în substraturile nutritive şi în mediile naturale (cu excepţia celor cu pH scăzut) şi, în plus, NH_4^+ este toxic.

Microorganismele folosesc patru căi principale de încorporare a NH_3 în compuşi organici:

1) Conversia directă a NH_3 la glutamat prin aminarea reductivă a unui intermediar al ciclului ATC α-cetoglutaratul la glutamat, sub acţiunea glutamat dehidrogenazei, după reacţia globală:

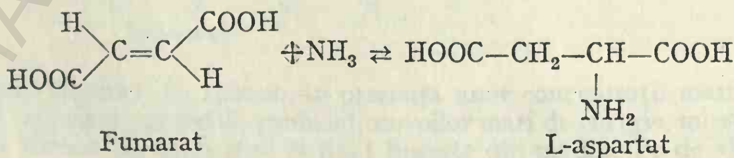


$$\underset{\alpha\text{-cetoglutarat}}{HOOC-CH_2-CH_2-CO-COOH} + NH_3 + NADPH + H^+ \leftrightarrows$$

$$\rightleftarrows \underset{\text{L-glutamat}}{HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH} + H_2O + NADP^+$$

Glutamatul este cel mai important bloc de construcţie produs prin asimilarea primară a NH_3, deoarece reprezintă o sursă majoră pentru sinteza altor aminoacizi (gruparea sa amino poate fi uşor transferată la alţi compuşi ai C prin reacţii de transaminare). După unii cercetători, glutamat dehidrogenaza nu ar fi foarte importantă în asimilarea primară a NH_3, deoarece la concentraţii foarte mici de NH_3 (<1 mM) enzima nu poate funcţiona eficient.

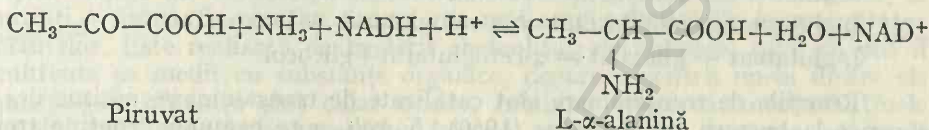
2) Unele bacterii pot asimila amoniacul utilizînd activitatea reversibilă a enzimei aspartatamonium liaza, numită comun aspartază, într-o reacţie care poate fi folosită şi pentru producerea de fumarat:



$$\underset{\text{Fumarat}}{(H)(HOOC)C=C(COOH)(H)} + NH_3 \rightleftarrows \underset{\text{L-aspartat}}{HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH}$$

Importanța relativă a celor două căi este controversată. Celulele de *E. coli* cultivate în medii sintetice, avînd o sare de amoniu ca unică sursă de N, conțin foarte multă glutamat dehidrogenază și doar o cantitate neînsemnată de aspartază, care este prezentă în cantitate mare la bacteriile cultivate pe medii bogate în aminoacizi, ceea ce sugerează, după Halpern și Umbarger (1960), că glutamat dehidrogenaza ar avea, în special, o funcție asimilatorie, în timp ce aspartaza ar juca un rol, în special, în catabolism. Studiile de genetică biochimică la *Neurospora crassa* și *Bacillus subtilis* au demonstrat că mutantele incapabile să facă sinteza glutamat dehidrogenazei devin concomitent auxotrofe pentru mai mulți aminoacizi.

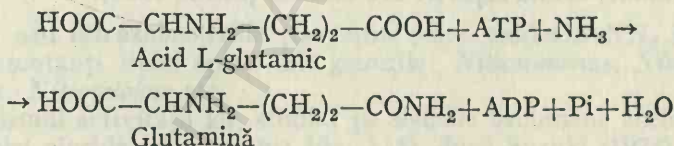
3) Majoritatea bacteriilor din genul *Bacillus* utilizează ca principal mecanism de încorporare a NH_3 în aminoacizi reacția catalizată de alanin dehidrogenază, descoperită de Wiame și Piérard (1955):



$$\underset{\text{Piruvat}}{CH_3-CO-COOH} + NH_3 + NADH + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{L-}\alpha\text{-alanină}}{CH_3-\underset{|}{\overset{}{C}}H(NH_2)-COOH} + H_2O + NAD^+$$

Calea aceasta este activă și la cele mai multe actinomicete.

4) Cea de-a patra cale, descrisă la *Acetobacter aerogenes*, avînd o importanță deosebită deoarece este activă la concentrații joase de NH_3, utilizează reacțiile cuplate ale glutamin sintetazei și glutamat sintetazei. Prima reacție implică sinteza inițială de glutamină, bazată pe capacitatea acidului L-glutamic de a funcționa el însuși ca acceptor pentru un NH_3 adițional, într-o reacție catalizată de glutamin sintetază, care necesită consum de ATP, cu formarea unei amide — glutamina (fig. 134):



$$\underset{\text{Acid L-glutamic}}{HOOC-CHNH_2-(CH_2)_2-COOH} + ATP + NH_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow \underset{\text{Glutamină}}{HOOC-CHNH_2-(CH_2)_2-CONH_2} + ADP + Pi + H_2O$$

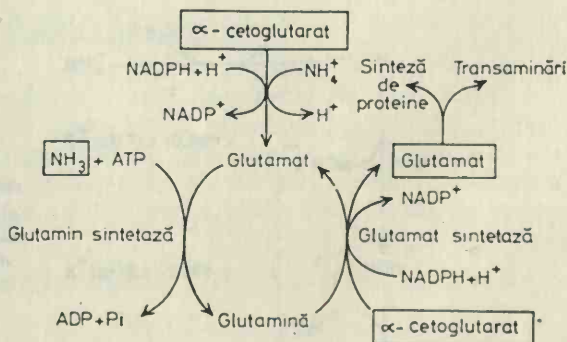


Fig. 134. — Asimilarea amoniacului pe calea reacțiilor cuplate ale glutamin sintetazei și glutamat sintetazei (după Gottschalk, 1978).

În reacția a doua, glutamat sintetaza catalizează transferul reducător al grupării amidă de la glutamină la α-cetoglutarat (α-oxoglutarat), cu for-

mare de glutamat. Glutamat sintetaza este cunoscută și sub denumirea de glutamin-α-oxoglutarat amino transferaza, fapt care explică denumirea utilizată curent de calea Gogat. Această cale funcționează la bacterii și la unele levuri în condiții de limitare a concentrației de NH_3.

Glutamina servește în sinteza unui număr important de compuși ca purinele, triptofanul, histidina, glucozamino-6-fosfat, ca și în formarea de carbamilfosfat, precursor important al compușilor pirimidinici.

Transaminările. Indiferent de calea de asimilare primară a azotului amoniacal (glutamat, alanină, aspartat), grupările amino din structura acestora pot fi transferate la alți aminoacizi prin reacții de transaminare. Spre exemplu, prin transaminare între acidul glutamic și alți metaboliți intermediari neazotați se pot realiza următoarele biosinteze:

L-glutamat + piruvat $\rightleftarrows$ α-cetoglutarat + alanină

L-glutamat + oxalilacetat $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarat + L-aspartat

L-glutamat + glioxilat $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarat + glicocol

Reacțiile de transaminare sînt catalizate de transaminaze, enzime descoperite la bacterii de Gunsalus (1950). *E. coli*, spre exemplu, conține trei transaminaze distincte: *transaminaza A*, care transferă gruparea — NH_2 de la glutamat, aspartat, tirozină, fenilalanină, triptofan, metionină și leucină la α-cetoacizii corespunzători; *transaminaza B*, care acționează pe glutamat, izoleucină, valină și leucină, și *transaminaza C*, activă pe valină și alanină. Transaminazele bacteriene au deopotrivă funcții anabolice și catabolice. În afară de modul de acțiune descris anterior, numeroși aminoacizi pot fi degradați printr-un proces care implică o transaminare inițială, ce asigură indirect dezaminarea, prin intermediul dehidrogenazelor specifice pentru acidul glutamic, acidul aspartic sau alanină (Senez, 1968).

MICROORGANISMELE CARE OXIDEAZĂ COMPUŞII AZOTULUI

(Pl. 18—20)

Nitrificarea este un proces biologic de oxidare a amoniacului sau a altor forme reduse ale azotului, rezultate în cursul procesului de amonificare, la nitraţi — forma de compus azotat cea mai uşor asimilabilă de majoritatea plantelor. Este realizată de bacterii chemolitotrofe obligate, care nu pot fi cultivate pe medii cu substanţe organice, deoarece pentru unele dintre ele substanţele organice sînt chiar toxice, inhibînd creşterea autotrofă. Unele tulpini de *Nitrobacter winogradskyi* folosesc acetatul, dar creşterea este mult mai lentă decît pe nitrit.

Biochimia procesului este relativ puţin cunoscută deoarece bacteriile nitrificatoare cresc foarte lent (timpul de generaţie ~ 10—12 ore) şi obţinerea unor cantităţi suficiente de celule pentru studiile de metabolism este relativ greu de realizat. Ele formează două grupuri fiziologic distincte.

NITRITBACTERIILE

Nitrit- sau **nitrozobacteriile** (bacteriile care oxidează NH_3 la nitriţi) au ca reprezentanţi tipici specii din genurile: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* etc.

Mecanismul activităţii lor, studiat pe sisteme bacteriene acelulare, este încă incomplet elucidat şi ar evolua (fig. 135), după Suzuki (1974), în patru

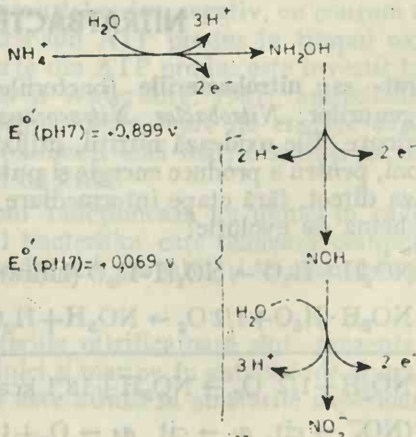


Fig. 135. — Schema reacţiilor de oxidare a NH_4^+ la nitrit de către bacteriile din genul *Nitrosomonas*.

faze succesive:

1) $NH_3+O_2+XH_2 \rightarrow NH_2OH+X+H_2O$

În această reacție, X ar fi citocromul P-460

2) $NH_2OH+2\ cit.c\,(Fe^{3+}) \rightarrow (NOH)+2\,H^++2\,cit.c\,(Fe^{2+})$

3) $2\ cit.c\,(Fe^{2+})+1/2\,O_2+2\,H^+ \rightarrow 2\,cit.c\,(Fe^{3+})$

4) $(NOH)+A+H_2O \rightarrow NO_2^-+AH_2+H^+$
nitroxil nitrit

Reacția globală: $NH_3+1\,1/2\,O_2 \rightarrow NO_2^-+H_2O+H^+$
($\Delta G^{\circ\prime}$ la pH 7,0 = —272 KJ/mol^{-1})

Fig. 136. — Reacțiile de oxidare ale amoniacului la nitrit, sub acțiunea bacteriilor și enzimele implicate în desfășurarea lor (după Gottschalk, 1979). Cheia enzimelor: 1. Reacția monooxigenazei (necuplată cu sinteza de ATP); 2. Hidroxilamină—citocrom *c* reductaza, cuplată cu o oxidază terminală; 3. Molecula ipotetică de nitroxil (NOH) este oxidată la nitrit, cu regenerarea XH_2, cosubstratul din reacția monooxigenazei.

Reacția globală implică un transfer net de șase electroni, ceea ce corespunde unei schimbări de valență a atomului de N de la —3 la +3. Deoarece transferul normal de electroni se face în grupuri de cîte doi, s-a sugerat că întregul proces ar implica transferul a trei loturi de cîte doi electroni (fig. 136).

NITRATBACTERIILE

Nitrat- sau **nitrobacteriile** (bacteriile care oxidează nitriții la nitrați) aparțin genurilor: *Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira* și trăiesc asociat cu cele anterioare. Ele oxidează nitriții, utilizînd O_2 molecular ca acceptor final de electroni, pentru a produce energie și putere reducătoare. Oxidarea nitriților s-ar realiza direct, fără etape intermediare, deși Allem (1968) propune următoarea schemă de evoluție:

1) $NO_2H+H_2O \rightarrow NO_2H\cdot H_2O$ (hidrat de acid azotos)

2) $NO_2H\cdot H_2O+1/2\,O_2 \rightarrow NO_3H+H_2O$

$NO_2H+1/2\ O_2 \rightarrow NO_3H+18{,}1$ kcal

($NO_2^- \rightarrow$ cit. $a_1 \rightarrow$ cit. $a_3 \rightarrow O_2+1$ ATP/NO_2^-)

Reacția de oxidare a nitriților este exergonică și poate fi direct legată de lanțul de respirație celulară pentru sinteza de ATP. Deoarece bacteriile nitrificatoare sînt autotrofe și reduc CO_2 la material celular pe calea ciclului

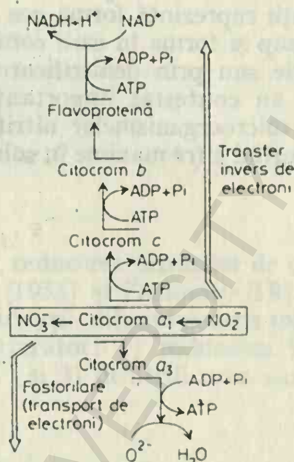


Fig. 137. — Schema reacțiilor de fosforilare prin transport de electroni și a transferului invers de electroni, la bacteriile care oxidează nitriții. Nitritul reduce cit. a_1; transferul electronilor la O_2 este cuplat cu sinteza de ATP. NAD^+ este redus datorită unui transfer invers de electroni dirijat de ATP, de la cit. a_1, via cit. *c*, cit. *b*, flavoproteină (după Gottschalk, 1979).

Calvin-Benson, producerea de putere reducătoare în formă de NADH are o foarte mare importanță. Compușii de tipul NH_3, NO_2^- etc. nu pot funcționa ca agenți reducători pentru NAD^+, deoarece potențialul lor redox este mult prea pozitiv în raport cu acesta. Astfel, potențialul redox al cuplului NH_4^+/NH_2OH este +0,899 v, cel al NO_2^-/NH_2OH este +0,066 v, iar al NO_2^-/NO_3^- este +0,42 v, în timp ce potențialul redox al cuplului $NAD^+/NADH + H^+$ este —0,32 v. Întrucît transferul electronilor are loc numai de la cupluri cu potențialul redox scăzut spre cupluri cu potențial redox mai ridicat, bacteriile nitrificatoare, în general, au un lanț transportor de electroni foarte scurt și, în plus, recurg pentru reducerea NAD^+ la un transfer invers de electroni („reverse electron transfer"), care necesită consum de energie. Datorită acestui fapt, electronii sînt „împinși în susul" lanțului respirator, de la un potențial redox pozitiv spre un potențial redox negativ, cu consum de energie, respectiv prin utilizarea unei părți din ATP produs în timpul oxidării (fig. 137). Este probabil, că o mare parte din ATP produs este investit în formarea de NADH (după Watson, Valos și Waterburg, 1981), aproximativ 3 ATP pentru doi electroni). Acest consum foarte mare de energie explică de ce creșterea la *Nitrobacter* necesită oxidarea unei mari cantități de nitrit și, de asemenea, de ce creșterea este atît de lentă.

Transferul invers de electroni funcționează nu numai în cazul nitrit-și nitratbacteriilor, ci și în acela al bacteriilor care oxidează compușii sulfului și fierului, precum și, cu unele modificări probabil, și în cazul bacteriilor care oxidează hidrogenul.

Semnificație biologică. Bacteriile nitrificatoare sînt prezente pretutindeni în sol, în bazinele acvatice, dulci și marine, în sistemele de epurare a apelor uzate. Densitatea maximă în sol este atinsă în straturile superioare (pînă la

10 cm), în bazinele acvatice la interfaţa dintre apă şi sedimente, pe pereţii tancurilor de aerare etc. În mări, se găsesc în special în zona cuprinsă între 0 şi — 200 m şi la interfaţa apă — sediment.

Nitrificarea este un proces cu importanţă excepţională în natură, deoarece nitraţii reprezintă forma cea mai uşor asimilabilă de către plante, dar în acelaşi timp şi forma în care compuşii N sînt cel mai uşor pierduţi din sol prin levigaţie sau prin denitrificare (Eliade şi colab., 1981). Deşi există şi autori care au contestat importanţa denitrificării, în general se consideră că numărul microorganismelor nitrificatoare este proporţional cu fertilitatea solului, asigurînd cifre maxime în solurile fertile, bine lucrate şi aerate (Pochon, 1958).

REDUCEREA NITRAȚILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

Descrisă inițial de Schonbein (1868), reducerea nitraților de către microorganisme se poate realiza, după Kluyver (1953) și Pichinoty (1973), prin trei mecanisme moleculare diferite, cu semnificații diferite pentru microorganismele efectoare și pentru mediul înconjurător: 1) reducerea asimilatorie 2) reducerea dezasimilatorie „incidentală" și 3) denitrificarea sau reducerea dezasimilatorie „adevărată".

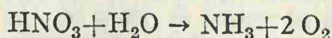
REDUCEREA ASIMILATORIE

Asimilarea nitraților efectuată de un număr extrem de mare de organisme (bacterii, fungi filamentoși și levuri, alge și plante superioare) este un proces care furnizează celulelor NH_3 utilizabil pentru biosinteza constituenților celulari. A fost studiat la un număr mare de bacterii din genurile: *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Actinomyces* etc. Lista completă a microorganismelor dotate cu această proprietate este greu de stabilit, deoarece ea nu a fost cercetată sistematic. După Delwiche și Bryan (1976), toate microorganismele sînt virtual capabile să reducă nitratul la NH_3 sau cel puțin la nivelul de ion nitrit, în timp ce după Gottschalk (1979), această proprietate ar fi prezentă la toate bacteriile care cresc utilizînd nitratul ca sursă de N.

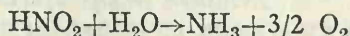
Reducerea asimilatorie a nitratului și cea dezasimilatorie nu sînt procese în mod obligatoriu corelate. Unele bacterii *(Ps. aeruginosa)* au ambele proprietăți (van Hartingsveldt și colab., 1971), altele *(Ps. perfectomarinus)* sînt denitrificatoare, dar nu pot asimila nitrații, și, în sfîrșit, altele asimilează nitrații, dar nu pot denitrifica. La organismele care reduc nitratul atît asimilator, cît și dezasimilator cele două procese pot fi separate prin expunere la O_2: *Ps. aeruginosa* asimilează nitratul atît în prezența, cît și în absența O_2, dar îl utilizează cu scop dezasimilator numai în anaerobioză. Cele două căi metabolice pot fi evidențiate separat și prin mutageneză: unele mutante pierd capacitatea de denitrificare, păstrînd-o pe cea de asimilare, altele pierd amîndouă proprietățile (Jeter și Ingraham, 1981).

Biochimia asimilării nitraților. Reducerea asimilatorie a nitraților, nitriților și hidroxilaminei a fost studiată de Hattori (1962) la *Anabaena cylindrica*, la care are loc în anaerobioză, în prezența luminii, cu producere de O_2,

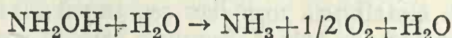
după reacțiile:



$$HNO_3+H_2O \rightarrow NH_3+2\,O_2$$



$$HNO_2+H_2O \rightarrow NH_3+3/2\ O_2$$



$$NH_2OH+H_2O \rightarrow NH_3+1/2\,O_2+H_2O$$

în care hidroxilamina poate funcționa ca intermediar numai sub forma unui complex enzimă — substrat.

Fewson și Nicholas (1961), ca și Payne (1973) au elaborat pe baza datelor experimentale existente două scheme de evoluție, relativ apropiate (fig. 138),

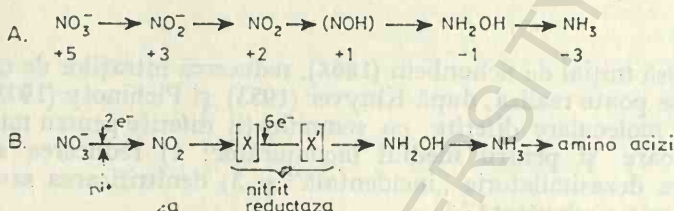


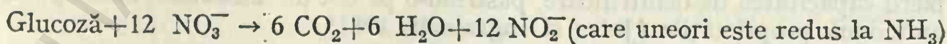
Fig. 138. — Reacțiile reducerii asimilatorii ale nitraților de către bacterii. A. Modelul lui Fewson și Nicholas (1961). Sub fiecare compus figurează numărul de oxidare al atomului de N. B. Modelul lui Payne, în care (x) și (x') sînt intermediari legați de enzime, încă necunoscute.

în care nitratul este primul intermediar sigur al asimilării nitraților la microorganisme, ca și la plante, celelalte etape fiind în mare măsură ipotetice. Enzima esențială a acestei căi, nitrat reductaza asimilatorie, numită de tip B de către Pichinoty (1966), pentru a o deosebi de enzima de tip A, activă în cursul denitrificării, este o enzimă solubilă, cu rol „nutritiv" și nu respirator ca tipul A. Ea este activă atît în aerobioză, cît și în anaerobioză. Formarea ei, ca și a nitrit reductazei este represată de prezența NH_3 în mediu.

Reducerea asimilatorie a nitratului și nitritului la NH_3 este o reacție care nu generează energie și, din contră, intră în competiție pentru electroni cu sistemele ce generează ATP, fiind în acest sens echivalentă cu o cheltuială de energie.

REDUCEREA DEZASIMILATORIE „INCIDENTALĂ"

Cunoscută și sub denumirea de „respirație nitrat/nitrit", reducerea „incidentală" este un proces monoenzimatic, constînd din reducerea unor cantități mari de nitrat la nitrit, care este eliminat, de regulă, ca atare, după reacția:



Glucoză $+12\ NO_3^- \rightarrow 6\ CO_2+6\ H_2O+12\,NO_2^-$ (care uneori este redus la NH_3)

Enzima care catalizează acest proces este produsă numai în condiții de anaerobioză sau de presiune scăzută de O_2. Procesul este puțin important

din punct de vedere fiziologic, deoarece utilizează cantități mari de nitrat pentru oxidarea unor cantități mici de substrat, iar nitriții formați sînt foarte toxici. De aceea, nu favorizează creșterea abundentă a microorganismelor care îi produc.

Reducerea dezasimilatorie „incidentală" a fost descrisă la un număr mare de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, aerobe și anaerobe sporulate și nesporulate, ca, de exemplu cele din genurile: *Shigella, Salmonella, Escherichia, Klebsiella, Serratia, Proteus, Brucella, Staphylococcus, Moraxella, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus.* Considerată ca un caracter biochimic cu importanță taxonomică, această proprietate este testată curent în bacteriologie, utilizînd proprietatea unei soluții mixte de acid sulfanilic 0,2% și de α-naftilamină 0,5% în acid acetic, de a colora în roșu mediile de cultură care conțin nitriți.

DENITRIFICAREA. REDUCEREA DEZASIMILATORIE „ADEVĂRATĂ"

Denitrificarea este un proces biologic efectuat în exclusivitate de bacterii și constă din reducerea dezasimilatorie a unuia sau a ambilor compuși ai azotului [nitratul (NO_3^-) și/sau nitritul (NO_2^-)] la oxizi gazoși ca oxidul de azot (NO) sau protoxidul de azot (N_2O), care pot fi ei înșiși reduși în continuare pînă la N gazos (N_2) (Knowles, 1982) (fig. 139). În acest proces, nitratul

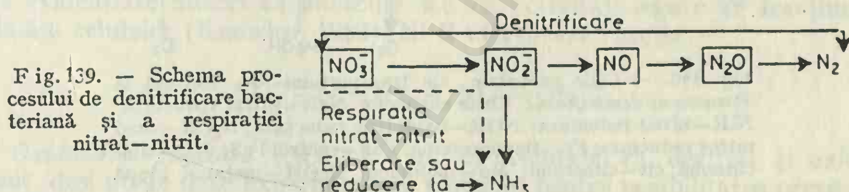
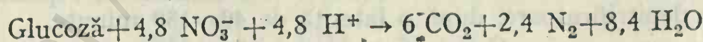


Fig. 139. — Schema procesului de denitrificare bacteriană și a respirației nitrat—nitrit.

sau produșii reducerii sale servesc ca acceptori de electroni pentru oxidarea unor compuși organici (uneori anorganici) și pentru producerea de energie (Delwiche și Bryan, 1976). Produsul final major al reducerii este N_2 (însoțit uneori de un produs de reducere parțială, N_2O), a cărui formare în mediile care conțin nitrați, în condiții de anaerobioză, asociată cu creșterea bacteriilor respective, reprezintă testul capacității denitrificatoare a microorganismului analizat. Reacția globală a denitrificării este:



$$\text{Glucoză} + 4{,}8\ NO_3^- + 4{,}8\ H^+ \rightarrow 6\ CO_2 + 2{,}4\ N_2 + 8{,}4\ H_2O$$

Bacteriile denitrificatoare formează un grup biochimic și taxonomic heterogen. Sînt cel mai adesea heterotrofe. Unele utilizează compuși cu C_1, în timp ce altele cresc autotrof în prezența H_2 și CO_2 sau a compușilor reduși ai sulfului. Contrar concepțiilor mai vechi, nici o bacterie denitrificatoare nu este strict anaerobă. Ele pot utiliza O_2 ca acceptor final de electroni și preferă chiar respirația aerobă, dacă aceasta este posibilă. Cresc în anaerobioză pe medii care conțin NO_3^-, NO_2^- și N_2O. În absența O_2 și a nitraților sînt capabile de reacții de fermentație.

În funcție de frecvența izolării, cele mai importante bacterii denitrificatoare aparțin genurilor *Pseudomonas* și *Alcaligenes* (Knowles, 1982), dar lista celor capabile să facă acest proces, deși incompletă, este foarte mare și include genurile: *Achromobacter, Alcaligenes (A. eutrophus, A. faecalis* etc.), *Azospirillum, Bacillus (B. licheniformis, B. azotoformans, Chromobacterium, Halobacterium (H. marismortui), Hyphomicrobium, Paracoccus (P. denitrificans), Pseudomonas (Ps. aeruginosa, Ps. aureofaciens, Ps. denitrificans, Ps. fluorescens), Thiobacillus (T. denitrificans)*, precum și bacteria fototrofă *Rhodopseudomonas sphaeroides*.

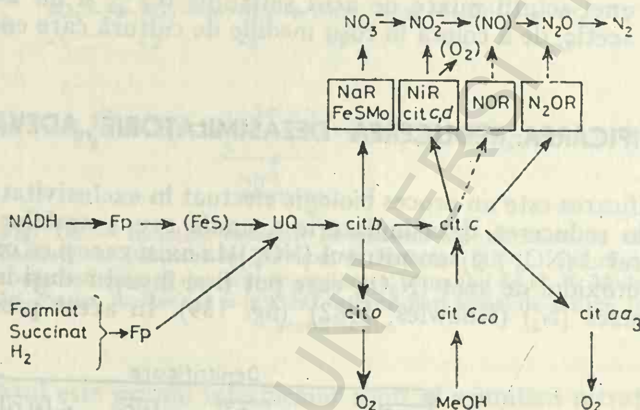


Fig. 140. — Căile probabile ale transportului de electroni la *Paracoccus denitrificans*. Cheia enzimelor: NaR—nitrat reductaza; NiR—nitrit reductaza; NOR—oxidnitric reductaza; N_2OR—oxid nitros reductaza; Fp—flavoproteină; FeS—centrul FeS; UQ—ubichinonă; cit—citocromi; Mo—molibden; MeOH—metanol (după Knowles, 1982).

Biochimia denitrificării este foarte complexă și pînă în prezent în mare parte neelucidată. Deși este mult studiată, nu s-a putut elabora un model general al evoluției sale, probabil datorită diferențelor mari dintre bacteriile capabile să facă acest proces. Denitrificarea este un proces multienzimatic, sensibil la prezența oxigenului. Enzimele necesare se formează numai în condiții de anaerobioză, cel mai adesea avînd nitratul ca inductor. Trecerea bacteriilor de la aerobioză la anaerobioză este urmată de represia sintezei enzimelor denitrificatoare, după o latență de 40—180 minute.

Denitrificarea este rezultatul unei cascade de procese respiratorii anaerobe (fig. 140) prin care nitratul este redus la N_2, trecînd printr-o serie de intermediari care servesc ca acceptori de electroni în succesiunea: nitrat $(NO_3^-) \xrightarrow{1}$ nitrit $(NO_2^-) \xrightarrow{2}$ oxid de azot $(NO) \xrightarrow{3}$ protoxid de azot $(N_2O) \xrightarrow{4}$ azot molecular (N_2), sub acțiunea a patru sisteme enzimatice:

Nitrat reductazele de tip dezasimilator sau Na-R de tip A (Pichinoty, 1971, 1973), pentru a le deosebi de cele de tipul B (asimilator), codificate de gene diferite, sînt enzime asociate cu fața internă a membranei plasmatice

a bacteriilor, capabile să efectueze reacția:



$$NO_3^- + 2\,e^- + 2\,H^+ \rightarrow NO_2^- + H_2O$$

Nitrit reductazele (Ni-R), numite și „enzime denitrificatoare", catalizează reducerea ionului de NO_2^- la produși gazoși. Sînt de două tipuri: a) metaloflavoproteine cu Cu și b) hemproteine de tipul citocromilor *c* și *d*, care pot

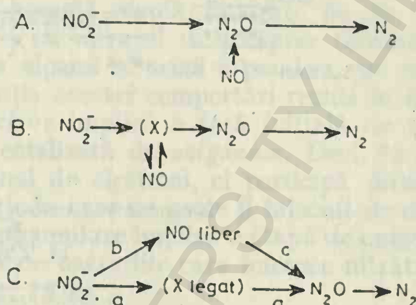


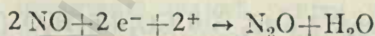
Fig. 141. — Căile alternative privind rolul oxidului nitric (NO) și al oxidului nitros (N_2O) în reducerea NO_2^- la N_2. A — funcționează la *Paracoccus denitrificans* și *Pseudomonas aeruginosa*; B — la *Ps. stutzeri*; Ca — la *Ps. denitrificans*; Cb — la Ps. *aureofaciens* (după Garber și Hollocher, 1981).

avea și activitate citocromoxidazică (Knowles, 1982). Sînt localizate în spațiul periplasmic la *Ps. aeruginosa* (Sarasate, 1978) și legate de membrana celulară la *Paracoccus denitrificans* (fig. 141). Este probabil că Ni-R sînt în realitate totdeauna legate de membrane, dar ușor solubilizabile, fapt care face să fie evidențiate uneori ca molecule sau ca activități legate de fracțiunea solubilă a celulelor (Knowles, 1982). Ni-R efectuează reacția:



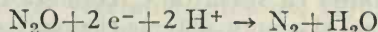
$$NO_2^- + e^- + H^+ \rightarrow NO + (OH)^-$$

Oxidnitric reductaza (NOR) are un rol discutabil ca, dealtfel, și oxidul de azot, deși unele date experimentale pledează pentru posibilitatea prezenței lui ca intermediar în denitrificare (fig. 142). NOR catalizează reacția:



$$2\,NO + 2\,e^- + 2^+ \rightarrow N_2O + H_2O$$

Oxidnitros reductaza (N_2OR) este o enzimă, de asemenea, legată de membranele celulare, care acționează asupra N_2O, intermediar liber obligatoriu în cursul reducerii oxizilor azotului la N_2, deși cînd denitrificarea decurge în condiții optime N_2O, nu se eliberează ca produs semnificativ. N_2OR efectuează reacția:



$$N_2O + 2\,e^- + 2\,H^+ \rightarrow N_2 + H_2O$$

Importanța fiziologică și caracterul singular al denitrificării rezidă în producerea de ATP în anaerobioză: nitratul servește ca acceptor terminal de electroni într-un lanț transportor de electroni. După reducerea nitratului se formează alți oxizi ai N, care, la rîndul lor, servesc ca acceptori terminali de electroni în aceleași sau în lanțuri diferite transportoare de electroni. Prin acest mecanism este asigurată oxidarea unor compuși organici (sau în cîteva

cazuri anorganici), ca reacţie primară producătoare de energie, de care organismele respective sînt dependente pentru creştere în condiţii anaerobe, sau în alte condiţii, în care procesul de denitrificare apare ca o secvenţă metabolică

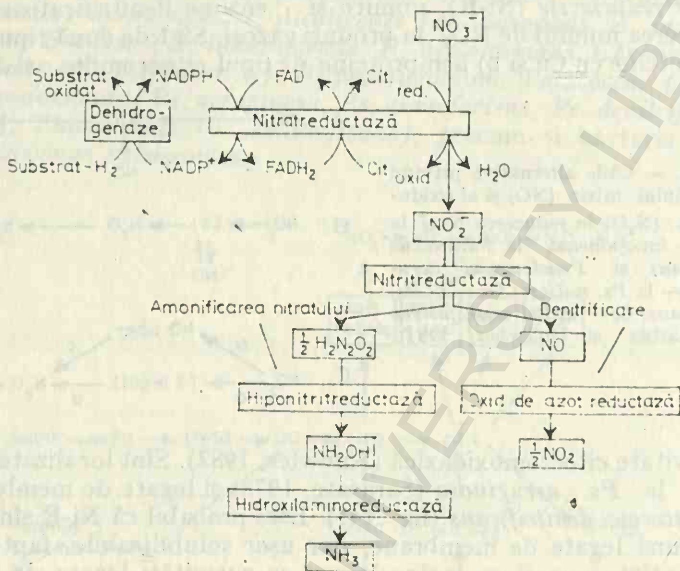


Fig. 142. — Reprezentarea schematică a căilor de reducere dezasimilatorie a nitratului, care se termină cu formare de amoniac (amonificarea nitratului) sau de azot molecular (denitrificare). Schema prezintă mai detaliat lanţul transportor de electroni pentru reacţia nitrat—nitrit (după Wiede, 1979).

preferată sau cel puţin competitivă. Cantitatea de energie liberă obţinută pe această cale este comparabilă celei obţinute prin respiraţie aerobă:

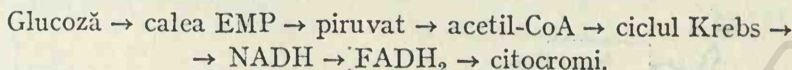
Respiraţie aerobă: Glucoză $+6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$ ($\Delta G^{o\prime} = 687$ kcal)

Denitrificare: Glucoză $+4,8\ NO_3^- + 4,8\ H^+ \rightarrow 6\ CO_2 + 2,4\ N_2 + 8,4\ H_2O$ ($\Delta G^{o\prime} = 638$ kcal)

Acest tip de metabolism nu este posibil decît în anaerobioză, deoarece O_2 represează sinteza reductazelor. În anaerobioză însă, nitratul are aceeaşi funcţie ca şi O_2 în aerobioză, permiţînd oxidarea completă la CO_2 şi apă a nutrienţilor organici, servind ca sursă de C, corelată însă cu formarea unor tipuri speciale de citocromi şi a unor sisteme enzimatice reductazice. Reacţia anaerobă cuplată cu reducerea nitraţilor este efectuată de bacterii aerobe care posedă un lanţ respirator, ce poate fi cuplat, după caz, fie cu reducerea O_2, fie cu aceea a nitratului. Ca şi respiraţia aerobă, denitrificarea, respiraţia anaerobă, permite oxidarea completă a substanţelor organice la CO_2.

În cazul bacteriilor denitrificatoare cultivate în anaerobioză, pe medii cu glucoză şi nitrat, glucoza este degradată pe calea Embden—Meyerhof—Parnas (calea glicolizei), iar acetil-CoA, formată de la piruvat, este oxidată

pe calea ciclului Krebs, care funcţionează în anaerobioză ca şi în aerobioză (Stanier, 1976; Gottschalk, 1979), în timp ce NADH şi $FADH_2$ servesc ca donatori de electroni pentru lanţul respirator după schema:



Glucoză → calea EMP → piruvat → acetil-CoA → ciclul Krebs → → NADH → $FADH_2$ → citocromi.

Există o singură excepţie de la această regulă, ilustrată de *Ps. aeruginosa*, care nu poate folosi anaerob — cu nitratul ca acceptor terminal de electroni — — anumite substraturi, ca alcanii şi acizii aromatici, pe care îi utilizează curent în aerobioză. Explicaţia acestei comportări rezidă în faptul că dezasimilarea substraturilor respective implică o fază iniţială de adiţie a 1—2 atomi de oxigen la substrat, catalizată de *oxigenaze*. Deci, în cazul lor, O_2 nu este numai acceptor terminal de electroni, ci participă direct şi la oxidarea iniţială a substratului, funcţie în care nu poate fi înlocuit de nitrat. În consecinţă, orice substrat a cărui dezasimilare implică o etapă de oxigenare nu poate fi dezasimilat în anaerobioză de bacteriile care folosesc nitratul ca acceptor terminal de electroni (Stanier, 1976).

Semnificaţie biologică. Denitrificarea este un proces biologic deosebit de important, deoarece reprezintă calea majoră de pierdere a compuşilor azotului importanţi pentru fertilitatea solului. Deşi la *Ps. aeruginosa* s-a demonstrat fără echivoc că nitrat reductaza dezasimilatorie şi alte enzime sînt codificate de gene cromosomale stabilite pe harta genetică (van Hartingsveldt şi Stouthamer, 1979), mulţi cercetători consideră că procesul ar putea fi codificat de plasmide pe baza următoarelor argumente: răspîndirea largă şi neobişnuită la procariote diferite; pierderea relativ uşoară a acestei proprietăţi (Hendric şi colab., 1974); necesitatea cultivării prelungite în anaerobioză, înainte ca întreaga capacitate de denitrificare să fie regenerată (Palleroni şi Doudoroff, 1972). Instabilitatea calităţii de denitrificator a dus la ideea unei lipse de semnificaţie taxonomică a acestei proprietăţi.

Microorganismele producătoare sînt răspîndite ubicvitar în sol, sedimentele apelor dulci şi marine, nămolul activat etc. Nu se cunoaşte grupul de microorganisme cu importanţă majoră pentru modificările apărute în condiţii naturale. Gradul de denitrificare într-un anumit mediu este estimat prin diferenţa dintre N total prezent sau adăugat şi cel care rămîne sau este pierdut după o perioadă de timp (Focht şi Verstraete, 1977).

Rata eliberării N_2 din sol prin denitrificare este mărită de creşterea umidităţii dincolo de limita care împiedică accesul O_2, de alcalinitatea uşoară, de creşterea moderată a temperaturii, de consumul O_2 de către rădăcinile plantelor şi microorganismele din sol şi de adăugarea masivă de îngrăşăminte azotate înainte de apariţia vegetaţiei (Stewart, 1970; Payne, 1973). Ea este redusă la minimum paralel cu uscăciunea, aerarea, aciditatea solului, agrotehnica adecvată şi adăugarea treptată de îngrăşăminte la intervale de timp, în cursul perioadei de creştere activă a plantelor.

Denitrificarea reprezintă o cale importantă de formare a N_2 atmosferic, fiind ultima treaptă a ciclului biogeochimic al elementelor în natură (fig. 143). Ea poate fi răspunzătoare de pierderea a 5—80% din îngrăşămintele azotate din sol. Denitrificarea reprezintă unul din mecanismele eficiente de reducere a conţinutului în N al apelor reziduale organice, bogate în nitraţi (spre exemplu, în cazul afluenţilor staţiilor de epurare, împiedicînd, prin aceasta, pericolul

de poluare şi eutrofizare a cursurilor de apă receptoare, în care aceştia sînt deversaţi. Unul din produşii denitrificării, protoxidul de N (N_2O), format în cantităţi crescînde, paralel cu extinderea utilizării îngrăşămintelor azotate,

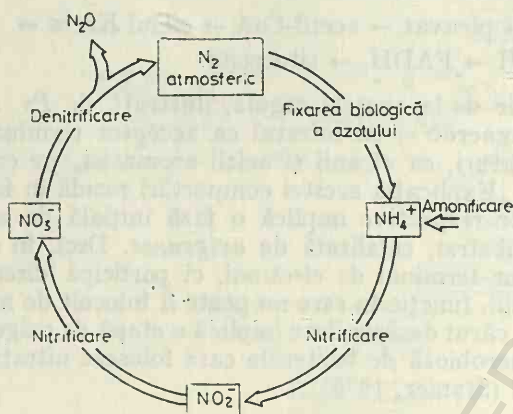


Fig. 143. — Rolul denitrificării în închiderea ciclului biogeochimic al azotului în natură.

difuzează în stratosferă, unde printr-o reacţie fotochimică este convertit la oxid de azot (NO). Acesta reacţionează cu ozonul, ducînd la scăderea concentraţiei acestuia şi la distrugerea barierei majore de protecţie a organismelor vii, faţă de acţiunea dăunătoare a radiaţiilor ultraviolete ($\lambda = 280-320$ nm) provenite din lumina solară (Delwiche şi Bryan, 1976; Payne, 1976). Deşi rolul denitrificării este greu de cuantificat, datorită ratei variabile cu care se manifestă în sistemele terestre şi acvatice, precum şi metodelor de măsură încă puţin adecvate, acest proces reprezintă un factor major în echilibrul global al N în natură, avînd pe lîngă efectele negative (pierderea de N_2, efectele poluante şi cele perturbatoare ale biosferei), şi potenţialitatea utilizării practice în scopuri utile pentru om. Cunoaşterea mecanismelor biochimice fundamentale ale denitrificării ar putea duce la aplicaţii practice importante pentru agricultură, legate în primul rînd, de stimularea reducerii oxizilor ionici ai azotului la NH_3 în locul transformării lor în produşi gazoşi, care se pierd în atmosferă.

DEGRADAREA PROTEINELOR DE CĂTRE MICROORGANISME

Proteinele complexe, ca și polipeptidele sînt degradate de microorganismele heterotrofe în afara celulelor, cu ajutorul enzimelor proteolitice, pînă la forme care pot intra în celulă, unde are loc utilizarea sau degradarea în continuare la compuși utili (fig. 144). Astfel, aminoacizii pot fi utilizați direct în sinteza proteinelor sau pot fi degradați mai departe la NH_3 și compuși simpli ai C, care apoi sînt refolosiți. Foarte multe categorii de microorganisme eliberează în mediu exoenzime proteolitice, care pot fi izolate din filtratul culturilor sau evidențiate, cînd se găsesc în concentrație mai mare, prin activitatea lor de lichefiere a gelatinei, hidroliza cazeinei etc. Microorganismele conțin și endoenzime proteolitice, care pot fi extrase după distrugerea celulei bacteriene prin îngheț — dezgheț, prin vibrații ultrasonice sau prin liză chimică. Ele atacă, de regulă, peptonele parțial degradate, nu însă și gelatina

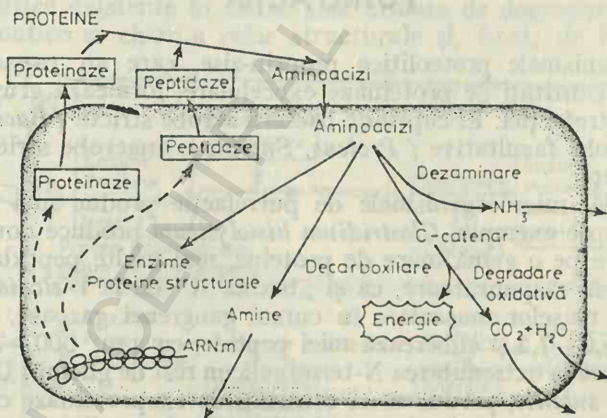
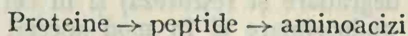


Fig. 144. — Reprezentarea schematică a proteolizei la bacterii și căile principale de utilizare a aminoacizilor rezultați (după Weide și Aurich, 1979).

sau albumina serică. Unele proteaze celulare permit anumitor bacterii să metabolizeze mici peptide exogene care au depășit bariera de permeabilitate a celulei. Degradarea proteinelor urmează schema:



Proteine → peptide → aminoacizi

Cele mai multe proteaze microbiene sînt puţin specifice şi acţionează asupra proteinelor ca şi asupra oligopeptidelor, producînd o fragmentare extremă a lanţului peptidic (de exemplu, proteazele de la *Streptomyces griseus* hidrolizează peste 80% din legăturile peptidice). Degradarea proteinelor este efectuată de două categorii de enzime.

Proteinazele (peptidil-peptid hidrolazele sau enzimele proteolitice) sînt cunoscute şi sub denumirea de *endopeptidaze*, deoarece atacă lanţul polipeptidic în interiorul său, clivîndu-l în peptide.

Unele sînt lipsite de specificitate şi hidrolizează orice legătură peptidică, în timp ce altele prezintă specificitate de acţiune, în sensul că recunosc anumite resturi de aminoacizi şi hidrolizează legăturile peptidice din vecinătatea lor. Specificitatea lor are uneori caracter de grup, deoarece se manifestă faţă de grupul aminoacizilor bazici, acizi aromatici etc.

Peptidazele sînt enzime care atacă secvenţial lanţul polipeptidic la nivelul extremităţilor sale, de aceea sînt denumite şi *exopeptidaze*, denumire care nu are nici o legătură cu sediul acţiunii lor (intra- sau extracelular). Unele clivează un aminoacid de la capătul N terminal şi sînt numite *aminopeptidaze (aminoacil-peptid hidrolaze)*, în timp ce altele, *carboxipeptidazele (acil-aminoacid hidrolazele)*, hidrolizează peptidele la nivelul grupării terminale libere, — COOH. Ambele tipuri de enzime degradează lanţul polipeptidic, eliberînd di- sau tripeptide, care sub acţiunea di- sau tripeptidazelor, formează aminoacizi liberi care sînt transportaţi în celule.

PUTREFACŢIA

Microorganismele proteolitice propriu-zise, care au capacitatea de a sintetiza mari cantităţi de proteinaze exocelulare, formează grupul fiziologic al agenţilor putrefacţiei. El cuprinde bacterii aerobe stricte *(Bacillus, Pseudomonas)*, anaerobe facultative *(Proteus, Sarcina)*, anaerobe stricte *(Welchia, Clostridium)* etc.

De regulă, microorganismele de putrefacţie produc mai multe tipuri de proteaze. Spre exemplu, *Clostridium histolyticum* produce două proteinaze distincte, active pe o gamă mare de proteine, mai multe peptidaze şi o colagenază specifică, răspunzătoare, ca şi „toxina K" de la *Welchia perfringens*, de distrugerea maselor musculare în cursul gangrenei gazoase. Aceasta este activă la pH 6,0—7,5 şi eliberează mici peptide, cu g.m. 500—700 dal, care au cel mai adesea la extremitatea N-terminală un rest de glicină. Unele bacterii, ca, de ex., *B. subtilis*, produc mari cantităţi de exoproteinaze cu importanţă industrială. Formarea enzimelor proteolitice la bacterii este represată de prezenţa în mediu a unui hidrolizat de proteine sau a unui amestec de aminoacizi, respectiv de produsul activităţii lor (Neumark şi Citri, 1962).

PROTEOLIZA INTRACELULARĂ

Este implicată în procesul de turnover (de regenerare constantă a proteinelor celulare prin degradare şi resinteză) şi în cel de autoliză. Ea este realizată de proteaze endocelulare şi în mod special de aminopeptidaze.

Procesul de turnover, care asigură în toate sistemele celulare un echilibru între sinteza proteinelor și degradarea lor, are loc chiar în culturi care cresc exponențial și se manifestă cu intensitate maximă în cursul etapelor de diferențiere celulară, cum este, spre exemplu, cea de sporogeneză la bacterii. După faptele de observație existente este evident că proteazele degradează mai ușor proteinele incomplet structurate, pe cele cu structură alterată și libere (în comparație cu cele legate de un substrat). Nu se cunoaște însă, modul în care proteazele celulare recunosc moleculele de proteine „vechi" de cele nou sintetizate. În celulele bacteriene pe cale de creștere, ~ 1—3 % din proteinele celulare sînt degradate la aminoacizi în fiecare oră (Setlow, 1975).

În funcție de natura lor, unele proteine sînt supuse unei rate de turnover mai rapid, iar altele uneia mai lente decît valoarea medie. Nath și Koch (1970) apreciază că la *E.coli* fracțiunea cu turnover rapid, care reprezintă 1—7 % din proteinele celulare, are un timp constant de înjumătățire de ~1 oră, indiferent de condițiile de creștere. În condiții de înfometare, ~ 30 % din proteina totală este supusă proteolizei intracelulare, în timp ce restul de 70 % pare să se păstreze stabilă. Rata procesului de turnover proteic crește în celulele de *E. coli* care cresc lent și în cele înfometate. În cazul creșterii rapide ea este limitată numai la o subfracțiune de proteine anormale sau lezate, în timp ce majoritatea celor normale sînt rezistente la proteoliză. Inhibarea metabolismului energetic blochează degradarea enzimatică intracelulară a proteinelor, ceea ce demonstrează că procesul are loc cu consum de ATP. Procesul de turnover proteic are probabil și o semnificație fiziologică, ca factor de reglare a concentrației enzimelor în celulele bacteriene.

Autoliza apare, de regulă, în celulele cu deficit marcat de ATP și de aminoacizi. În aceste condiții, represia sintezei proteinelor și activarea enzimelor proteolitice existente în celulă sînt urmate de degradarea proteinelor intracitoplasmatice și chiar a celor structurale și, final, de liză (fig. 145).

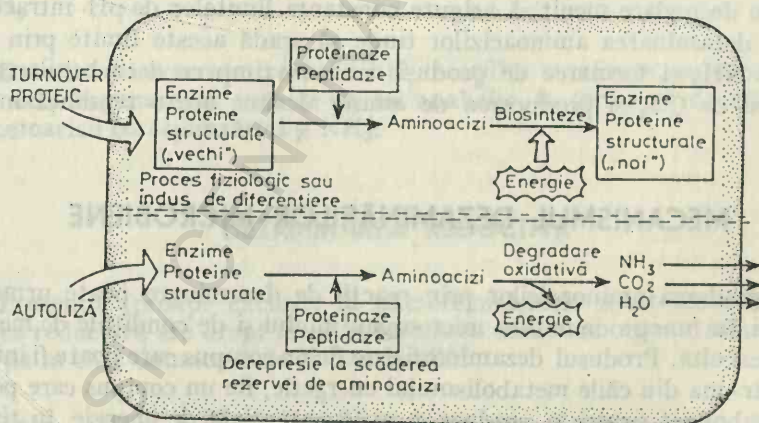


Fig. 145. — Reprezentarea schematică a reacțiilor de proteoliză intracelulară la bacterii, realizate prin turnover proteic și în cursul autolizei (după Weide și Aurich, 1979).

UTILIZAREA AMINOACIZILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

Aminoacizii și peptidele cu masa moleculară mică produse prin proteoliza diferitelor proteine vegetale, animale și microbiene sînt transportate activ în celulă și utilizate pentru creștere de cele mai multe microorganisme. Unii aminoacizi sînt atît de înrudiți structural cu intermediarii căilor centrale ale metabolismului celular, încît degradarea lor este foarte ușor de realizat. În cele mai multe cazuri, ea implică conversia inițială a fiecărui aminoacid la cetoacidul corespunzător (glutamat→α-cetogutarat; aspartat → oxalilacetat; alanină→ piruvat; valină→ 2-cetoizovaleriat; leucină→ 2-ceto-3-metilvaleriat) (Gottschalk, 1979).

Metabolismul aminoacizilor implică obișnuit fie îndepărtarea grupărilor amino, fie a celor carboxil, corespunzînd celor două căi principale, *dezaminarea* și *decarboxilarea*. Foarte multe microorganisme posedă amîndouă aceste activități, putînd să le folosească alternativ în funcție de pH, deoarece aminoacid dezaminazele sînt sintetizate numai în mediu alcalin, iar aminoacid decarboxilazele numai în mediu acid. Această comportare corespunde unui mecanism de reglare menit să asigure constanța limitelor de pH intracelular, deoarece dezaminarea aminoacizilor tinde să scadă aceste limite prin eliminarea de NH_3 și formarea de produși acizi, în timp ce decarboxilarea prin eliminarea de CO_2 și producerea de amine alcaline are o tendință inversă.

MECANISMUL DEZAMINĂRILOR MICROBIENE

Degradarea aminoacizilor prin reacții de dezaminare poate urma mai multe căi, în funcție de natura microorganismului și de condițiile de mediu în care se dezvoltă. Produsul dezaminării este fie un compus care poate fi introdus direct într-una din căile metabolismului energetic, fie un compus care poate fi ușor metabolizat pentru a produce o sursă potențială de energie, în timp ce NH_3 poate fi ulterior folosit pentru sinteza altor substanțe azotate.

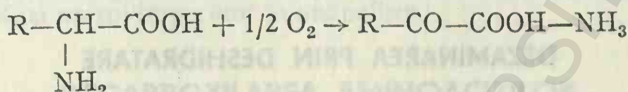
Mecanismul dezaminărilor microbiene nu este în întregime clarificat. Aminoacid dezaminazele produse de microorganisme sînt foarte diferite și cuprind enzime oxidative, care acționează prin dehidrogenarea substratului, cît și enzime neoxidative.

DEZAMINAREA OXIDATIVĂ

Reprezintă calea cea mai comună și are ca schemă generală dehidrogenarea enzimatică a aminoacidului cu formarea unui iminoacid, care este ulterior hidrolizat printr-o reacție neenzimatică, cu formare de NH_3 și α-cetoacidul corespunzător. La microorganisme, ca și la animalele superioare acest tip de dezaminare poate fi realizat prin două mecanisme diferite:

a) Oxidarea cu L- și D-aminoacid oxidaze

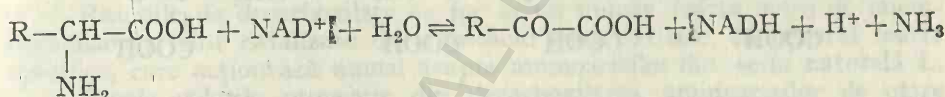
Numeroase microorganisme (*Proteus* sp., *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* ș. a.) conțin L-aminoacid oxidaze nespecifice, care acționează uneori asupra a 10—16 aminoacizi din seria naturală, după reacția:



$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + 1/2\ O_2 \rightarrow R-CO-COOH-NH_3$$

b) *Oxidarea cu L-aminoacid dehidrogenaze*

A fost descrisă atît la bacterii aerobe, cît și la cele anaerobe. La unele bacterii (*B. subtilis*), dehidrogenazele au drept coenzimă NAD^+, iar la altele (*E. coli*), $NADP^+$. În general, sînt puțin specifice și acționează asupra mai multor aminoacizi, al căror număr și natură variază de la un microorganism la altul, după reacția:

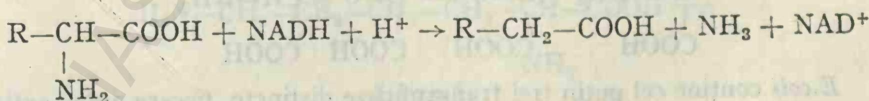


$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons R-CO-COOH + NADH + H^+ + NH_3$$

Datorită caracterului reversibil al reacțiilor catalizate, se consideră că aceste dehidrogenaze ar avea și un rol anabolic, în formarea de aminoacizi, de la cetoacizii corespunzători și NH_3.

DEZAMINAREA REDUCTIVĂ

Prezentă aproape exclusiv la microorganismele strict anaerobe, dezaminarea reductivă are drept rezultat formarea unui acid organic saturat, după o reacție în care donatorul de H este NADH:

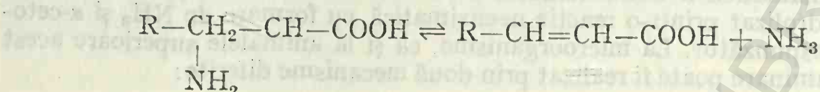


$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + NADH + H^+ \rightarrow R-CH_2-COOH + NH_3 + NAD^+$$

Un exemplu caracteristic este cel al bacteriilor din genul *Clostridium*, care dezaminează glicocolul pentru a produce acetat.

DEZAMINAREA DESATURANTĂ

Are drept rezultat formarea acidului organic nesaturat corespunzător și de NH_3, după reacția:

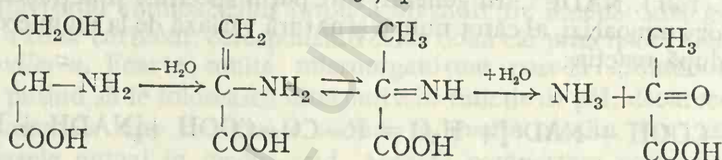


$$R-CH_2-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \rightleftharpoons R-CH=CH-COOH + NH_3$$

Echilibrul reacției este favorabil dezaminării, dar adesea compatibil cu funcționarea sa reversibilă, ca, de exemplu, în cazul aspartazei (acid aspartic $\rightleftharpoons$ acid fumaric + NH_3). Enzimele respective (aspartaza, metilaspartaza, histidaza etc.) sînt prezente la o largă gamă de microorganisme aerobe și anaerobe (*E.coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Neurospora* etc.).

DEZAMINAREA PRIN DESHIDRATARE

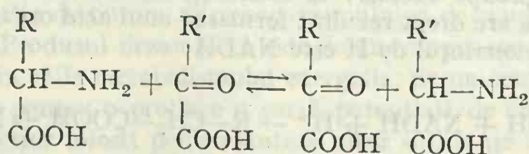
Reprezintă o modalitate de dezaminare exclusiv microbiană, aplicabilă hidroxiaminoacizilor. A fost studiată la *E. coli* și *Neurospora crassa* la care, spre exemplu, eliminarea enzimatică a unei molecule de apă convertește L-serina în acid aminoacrilic, care se tautomerizează la forma imino și se hidrolizează chimic cu formare de NH_3 și piruvat:



$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CH-NH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} \xrightarrow{-H_2O} \begin{matrix} CH_2 \\ \| \\ C-NH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ C=NH \\ | \\ COOH \end{matrix} \xrightarrow{+H_2O} NH_3 + \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ C=O \\ | \\ COOH \end{matrix}$$

TRANSAMINAREA

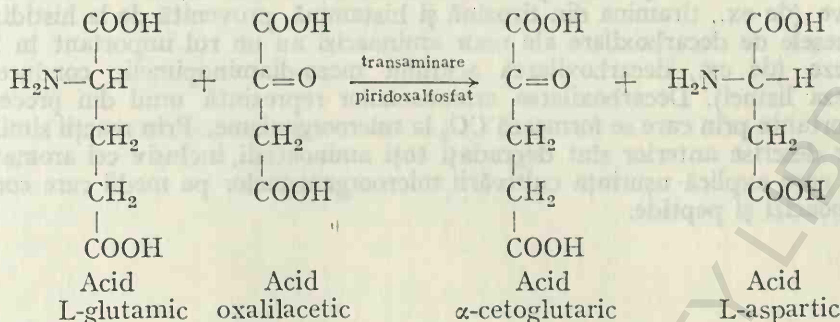
Reprezintă o reacție specială de dezaminare produsă sub acțiunea unor enzime specifice — transaminazele — prin care gruparea NH_2 a unui aminoacid este transferată în poziția α a unui α-cetoacid, fără formare de NH_3 liber. În felul acesta, α-cetoacidul devine un aminoacid diferit, în timp ce primul aminoacid (cel care a cedat NH_3) devine cetoacid. Transaminazele bacteriene, ca și cele de la animale sînt enzime cu piridoxalfosfat drept coenzimă. Ele catalizează reacția generală reversibilă:



$$\begin{matrix} R \\ | \\ CH-NH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} + \begin{matrix} R' \\ | \\ C=O \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} R \\ | \\ C=O \\ | \\ COOH \end{matrix} + \begin{matrix} R' \\ | \\ CH-NH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}$$

E.coli conține cel puțin trei transaminaze distincte, fiecare avînd activitate față de un anumit grup de aminoacizi și față de α-cetoacizii corespunzători. Reacțiile de transaminare sînt efectuate frecvent de toate microorganismele în cursul catabolismului aminoacizilor. Un exemplu caracteristic este

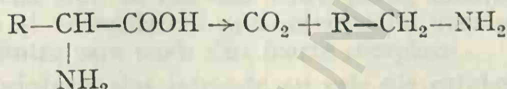
reprezentat de reacţia:



Datorită mecanismului lor de acţiune, transaminazele au, pe lîngă funcţia catabolică, şi un rol important în anabolism.

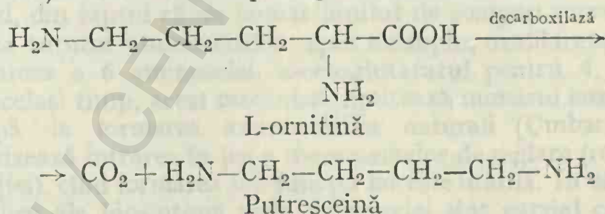
DECARBOXILAREA AMINOACIZILOR

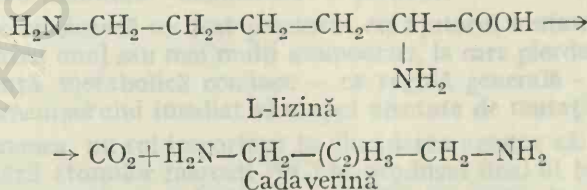
Pe lîngă procesele de dezaminare, decarboxilarea reprezintă cea de-a doua cale majoră de degradare a aminoacizilor la microorganisme. Ea duce la eliberarea de CO_2 şi formarea aminei corespunzătoare, după reacţia generală:



Reacţiile de decarboxilare au loc la un număr foarte mare de microorganisme şi sînt catalizate de aminoacid decarboxilaze, în general foarte specifice, care acţionează numai asupra aminoacizilor din seria naturală L.

Bazele volatile provenite din decarboxilarea aminoacizilor de către bacteriile proteolitice sînt răspunzătoare de mirosul caracteristic al putrefacţiilor. Unele dintre ele (putresceina şi cadaverina) produse prin decarboxilarea aminoacizilor dibazici, L-ornitina şi L-lizina, sînt foarte toxice şi pot produce intoxicaţii alimentare după ingestia cărnii alterate:





Unele amine produse prin decarboxilare microbiană sînt farmacologic active (de ex., tiramina din tirozină şi histamină, provenită de la histidină). Procesele de decarboxilare ale unor aminoacizi au un rol important în biosinteze (de ex., decarboxilarea acidului mezo-diaminopimelic conduce la sinteza lizinei). Decarboxilarea aminoacizilor reprezintă unul din procesele importante prin care se formează CO_2 la microorganisme. Prin reacţii similare celor descrise anterior sînt degradaţi toţi aminoacizii, inclusiv cei aromatici, fapt care explică uşurinţa cultivării microorganismelor pe medii care conţin aminoacizi şi peptide.

BIOSINTEZA AMINOACIZILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

Aminoacizii necesari pentru sinteza proteinelor de către microorganisme pot fi găsiți, ca atare, în mediu, unde provin, de regulă, din acțiunea enzimelor proteolitice extra- sau intracelulare. În cazul microorganismelor cultivate pe medii cu N anorganic sau cu un număr restrîns de aminoacizi, toți aminoacizii sau respectiv cei care lipsesc trebuie sintetizați în cursul metabolismului.

Biosinteza aminoacizilor de către microorganisme are următoarele particularități;

— Asemenea celor mai multe căi biosintetice, căile de sinteză ale celor ~ 20 de aminoacizi sînt, în cea mai mare parte, diferite de cele utilizate pentru degradare și se realizează prin intermediul unor secvențe multienzimatice diferite, dintre care unele sînt foarte complexe.

— Căile biosintezei sînt intricate cu cele ale catabolismului, deoarece mulți acizi organici, care aparțin metabolismului intermediar al glucidelor, sînt folosiți ca precursori ai aminoacizilor.

— Cu excepția histidinei, care urmează o cale de biosinteză izolată, ceilalți 19 aminoacizi naturali sînt derivați pe căi biosintetice ramificate, avînd ca punct de plecare un număr relativ mic de precursori metabolici care pot fi grupați în funcție de originea lor biosintetică în 6 „familii" (tabelul nr. 31).

Această modalitate de biosinteză prezintă o serie de avantaje decurgînd, în primul rînd, din faptul că un număr limitat de compuși servesc ca substrat pentru sinteza tuturor aminoacizilor: spre exemplu, oxalilacetatul este folosit pentru biosinteza a 6 aminoacizi, α-cetoglutaratul pentru 4, iar piruvatul pentru 3. În același timp, acest mecanism limitează numărul enzimelor (~100) care participă la formarea aminoacizilor naturali (Umbarger și Davis, 1962) și favorizează intrarea în joc a mecanismelor de reglare (represia sintezei și retroinhibiției), cînd formarea sau funcția lor este inutilă. În sfîrșit, frecvent, căile metabolice ale biosintezei unor aminoacizi sînt parțial comune, ca, de ex., cele pentru „familiile" oxalilacetat și piruvat.

Căile de biosinteză au fost precizate cu ajutorul mutantelor bacteriene auxotrofe pentru unul sau mai mulți aminoacizi, la care pierderea unei enzime dintr-o secvență metabolică conduce — ca regulă generală — la acumularea în mediu a precursorului imediat al etapei afectate de mutație.

De asemenea, un rol important în elucidarea acestor căi a avut-o urmărirea repartizării atomilor marcați (^{14}C) în produsul final al biosintezei sau în intermediarii săi, precum și izolarea și purificarea enzimelor care catalizează

Tabelul nr. 31

Precursorii pentru biosinteza aminoacizilor

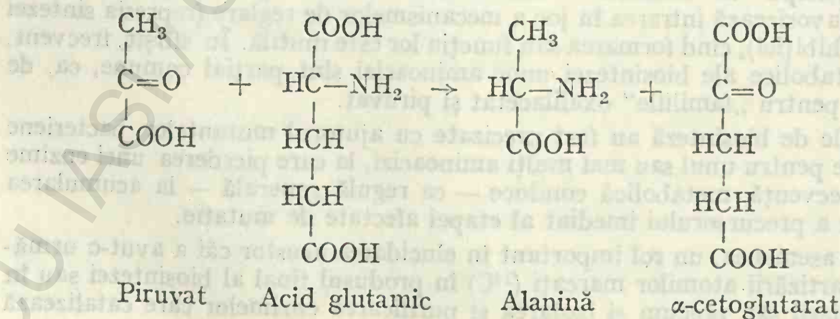
Precursorul	Aminoacizii produși	Numele „familiei"
Piruvat	Alanină, valină, leucină	Piruvat
Oxalilacetat	Acid aspartic, asparagină, metionină, treonină, izoleucină, lizină	Aspartat
α-cetoglutarat	Glutamat, glutamină, arginină, prolină	Glutamat
3-fosfoglicerat	Serină, glicocol, cisteină	Serină
Fosfoenolpiruvat eritrozo-4-fosfat	Fenilalanină, tirozină, triptofan	Aromatică
Fosforibozil-pirofosfat + ATP	Histidină	—

diferitele etape ale procesului. S-a demonstrat că nevoile nutritive ale bacteriilor auxotrofe pentru un anumit aminoacid pot fi satisfăcute nu numai de acest aminoacid, ca atare, ci și de precursorii săi.

Microorganismele diferă în ceea ce privește capacitatea lor de a sintetiza aminoacizi. Unele bacterii (de exemplu, *Leuconostoc mesenteroides*) nu pot crește decît dacă găsesc în mediu 16 aminoacizi diferiți. Această categorie de microorganisme nu se poate dezvolta decît în mediile bogate în aminoacizi preformați, prin descompunerea substanțelor de proveniență proteică. Alte bacterii, ca *E. coli*, pot sintetiza toți aminoacizii necesari pornind de la NH_3. Deși cele mai multe microorganisme necesită o formă redusă de N, ca amoniacul, numeroase bacterii și fungi pot utiliza, ca și plantele superioare, nitriții sau nitrații.

Biosinteza aminoacizilor pune două probleme fundamentale, reprezentate de sinteza „scheletului format din atomii de C" și fixarea grupării NH_2.

În unele cazuri, de exemplu, în *sinteza alaninei* de la piruvat, se sintetizează în primul rînd „scheletul de C", iar gruparea NH_2 este adăugată ulterior printr-o reacție de transaminare:



În alte cazuri, „scheletul de C" derivă direct de la intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici: de exemplu, acidul aspartic de la oxalilacetat și acidul glutamic de la α-cetoglutarat. La rîndul lor, acești doi aminoacizi devin precursori ai altor aminoacizi (fig. 27).

Biosinteza aminoacizilor aromatici (L-tirozină, L-fenilalanină și L-triptofan) este foarte complicată și este inițiată printr-o condensare între fosfoenolpiruvat (PEP) și eritrozo-4-fosfat, pentru a produce un intermediar fosforilat cu 7 atomi de carbon. Acesta suferă o ciclizare, pentru a forma acid 5-dehidroquinic, care devine ciclul aromatic al produșilor finali. Adiția unei noi molecule de PEP la un ultim intermediar hidroaromatic — acidul 5-fosfoshikimic — furnizează atomii de C pentru lanțurile laterale ale tirozinei și fenilalaninei. Produsul acestei a doua condensări, acidul chorismic este situsul primei divergențe metabolice. În continuare, el poate fi convertit fie la acid prefenic , precursorul fenilalaninei și al tirozinei, fie la acid antranilic, precursorul triptofanului.

Biosinteza lizinei. Spre deosebire de ceilalți aminoacizi, care sînt sintetizați pe aceleași căi la toate organismele, lizina urmează căi alternative, în funcție de natura organismelor (fig. 146).

Prima cale are ca intermediar-cheie acidul α,ε-diaminopimelic (ADAP), iar cea de-a doua, acidul α-aminoadipic (AAA). Vogel (1965), precum și

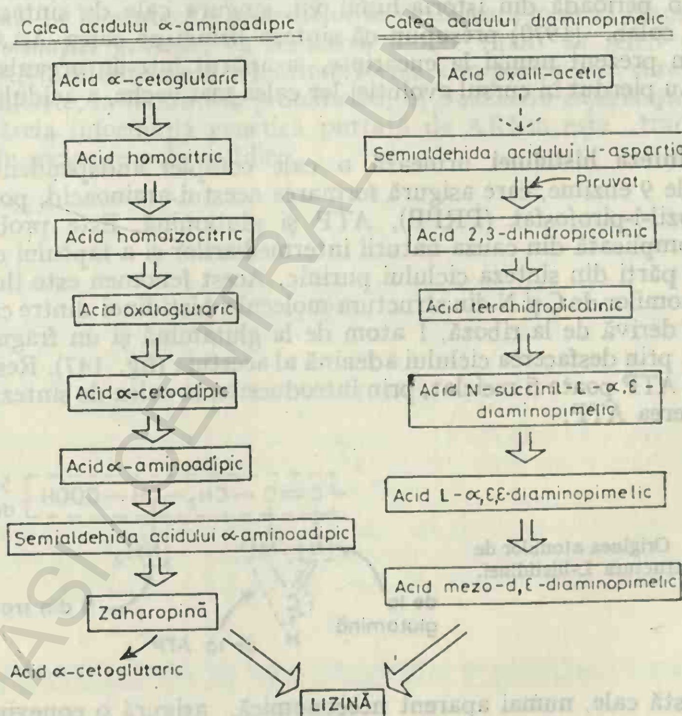


Fig. 146. — Reprezentarea schematică comparativă a evoluției reacțiilor de biosinteză a lizinei prin calea acidului α-aminoadipic și a acidului diaminopimelic.

Vogel, Thompson și Shockman (1970) au studiat prezența celor două căi la diferite categorii de organisme, cu ajutorul anumitor trasori (aspartat, alanină, acetat) marcați specific cu C radioactiv (^{14}C).

Calea acidului diaminopimelic (ADAP) a fost întîlnită la toate microorganismele procariote studiate și este caracteristică diferitelor categorii de bacterii, inclusiv cianobacteriilor. Ea a mai fost întîlnită la algele verzi *(Chlorella)*, unele *Phycomycetes (Saprolegniales, Peronosporales, Leptomitales, Hyphochytriales* etc.), la *Bryophytes* și la *Tracheophytes (Azolla, Ginkgo, Melilotus, Lemna)*. Calea are ca punct de plecare un intermediar al ciclului Krebs, acidul oxalilacetic, care prin transaminare cu glutamatul formează acid aspartic. Acesta formează semialdehida acidului aspartic (via acid aspartic→asparagină → aspartilfosfat), care împreună cu piruvatul formează acid 2,3-dihidropicolinic, constituent caracteristic al sporului bacterian. De la acesta, pe calea acidului tetrahidropicolinic și a trei derivați ai acidului diaminopimelic, se ajunge la sinteza lizinei.

Calea acidului α-aminoadipic (AAA) este prezentă la *Euglena*, la unele *Phycomycetes (Chytridiales, Blastocladiales, Mucorales)*, la *Ascomycetes* și la *Basidiomycetes*. Animalele superioare, ca și unele protozoare nu pot sintetiza lizina. Din aceasta decurge necesitatea de a o găsi ca atare în nutrienți.

Este probabil că sinteza lizinei pe calea ADAP a apărut inițial, în cursul evoluției, deoarece este prezentă atît la procariote, cît și la eucariote, și a fost, probabil, o perioadă din istoria lumii vii, singura cale de sinteză a lizinei. Vogel și colab. (1970) presupun că sinteza lizinei pe calea AAA, care este întîlnită în prezent numai la eucariote, a apărut într-un organism ai cărui strămoși au pierdut în cursul evoluției lor calea mai veche, a acidului diaminopimelic.

Biosinteza histidinei urmează o cale complet independentă și este realizată de 9 enzime, care asigură formarea acestui aminoacid, pornind de la 5-fosforibozil-l-pirofosfat (PRPP), ATP și glutamină. Este probabil calea cea mai complicată din cauza naturii intermediarilor și a faptului că se suprapune unei părți din sinteza ciclului purinic. Acest fenomen este ilustrat și de originea atomilor de C și N din structura moleculei histidinei dintre care 5 atomi de carbon derivă de la riboză, 1 atom de la glutamină și un fragment C—N de la ATP, prin desfacerea ciclului adenină al acestuia (fig. 147). Restul ciclului adenină al ATP poate fi reciclat, prin introducerea în calea de sinteză a purinei și în refacerea ATP.

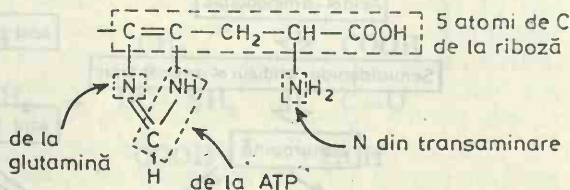


Fig. 147. — Originea atomilor de C și N din structura L-histidinei.

Această cale, numai aparent neeconomică, asigură o conexiune intimă între biosinteza histidinei și aceea a nucleotidelor purinice: ATP este degradat în cursul sintezei histidinei, dar produsul acestei degradări poate reintra în calea de sinteză a purinei, într-o etapă relativ avansată a procesului respectiv.

BIOSINTEZA PROTEINELOR *)

Structura proteinelor — agenţi universali ai activităţii biologice, fie ea biochimică, fiziologică sau morfogenetică — este legată de aceea a acizilor nucleici, agenţi universali ai conservării, exprimării şi transmiterii potenţialului ereditar, iar structura fiecărei proteine în parte este riguros definită de o porţiune determinată a materialului genetic al celulei.

Biosinteza proteinelor implică transmiterea informaţiei genetice de la molecula de acid nucleic, unde este codificată, la „dispozitivul" celular producător de proteine — ribosomii — în aşa fel încît secvenţa nucleotidelor să se traducă printr-o anumită secvenţă a aminoacizilor în lanţul polipeptidic care constituie structura de bază a proteinei. Asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, determinată, constituie una din principalele funcţii ale materialului genetic.

Mecanismul biosintezei proteinelor a fost „descifrat" prin cercetări pe sisteme acelulare de *E. coli*. Extractele bacteriene folosite conţineau un ARN mesager sintetic ca matriţă, un amestec de aminoacizi naturali — dintre care unul era marcat radioactiv — ribosomi, enzime, o sursă de energie, reprezentată de ATP, un sistem capabil să regenereze ATP, constînd din creatinfosfat, creatin fosfokinază şi guanozintrifosfat, precum şi Mg^{2+} şi K^{+}. După o oră de incubare la 37°C, în sistem apar primele proteine radioactive.

Procesul de biosinteză a proteinelor se desfăşoară în două etape: a) *transcrierea informaţiei genetice*, cu formarea a trei tipuri de ARN — ARNm, ARNr şi ARNt, diferite mult ca mărime, formă, compoziţie etc., care participă, cu funcţii diferite, la biosinteza proteinelor; b) *traducerea informaţiei genetice*, în cursul căreia informaţia genetică purtată de ARNm este „tradusă" sau convertită în secvenţe polipeptidice.

---

*) Problema va fi pe larg tratată în volumul III.

SECREȚIA ENZIMELOR EXTRACELULARE LA MICROORGANISME

Prezența proteinelor enzimatice în mediile de cultură lichide ale bacteriilor și fungilor este cunoscută de foarte mult timp. În unele cazuri, ea este consecutivă morții și lizei unor celule din cultura respectivă. De foarte multe ori însă, eliberarea lor este consecința unui proces de secreție, care nu se însoțește de modificări vizibile ale integrității celulelor microbiene. Termenul de secreție este folosit pentru a evidenția asemănarea acestui proces la microorganisme cu secreția enzimelor și a hormonilor proteici în celulele animale. „Secreția" proteinelor implică trecerea lor prin membrana plasmatică (fig. 148). Cele care au suferit acest transfer se numesc *proteine extracelulare*

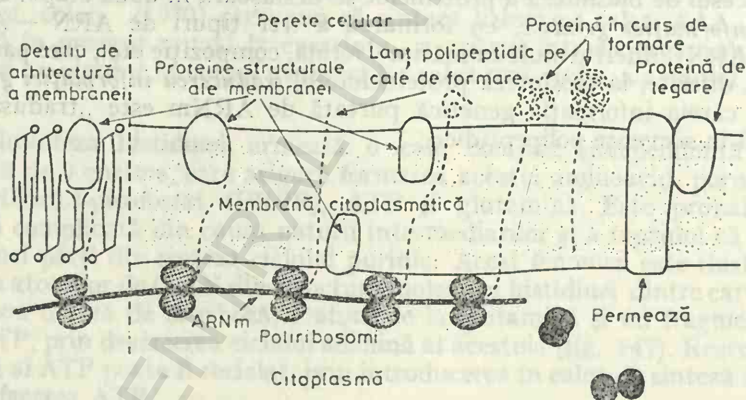


Fig. 148. — Relațiile structurale și moleculare în cursul sintezei și secreției proteinelor extracelulare prin membrana plasmatică (după Costerton și colab., 1974).

sau *exoproteine*, chiar dacă rămîn asociate cu celulele, prin localizarea lor în spațiul periplasmatic, cum este cazul la bacteriile Gram-negative, datorită prezenței membranei externe a peretelui celular (Glenn, 1976).

PROPRIETĂȚILE EXOPROTEINELOR MICROBIENE

Proteinele extracelulare sînt, în general, molecule proteice, care există libere în mediu, complet disociate de celule. Ele părăsesc celulele în care au fost sintetizate, fără ca alterarea structurii acestora să depășească limita

maximă compatibilă cu procesele de creștere și reproducere ale celulei (Pollock, 1963). Pot fi legate de membrane în celulele tinere și eliberate ca exoenzime pe măsură ce cultura intră în faza staționară, sau pot fi „solubilizate" prin procedee relativ blînde (de ex., spălarea celulelor cu apă sau cu soluții saline concentrate).

Exoproteinele bacteriene sînt molecule relativ mici, cele mai multe avînd masa moleculară ~ 20 000 — 40 000 dal. Sînt de regulă lipsite de rigiditate datorită lipsei cistinei și a legăturilor —S—S—, fapt care înlesnește trecerea lor prin membrane sau prin alte bariere externe (Pollock și Richmond, 1962). Unele sînt glicoproteine, dar cele mai multe sînt lipsite de un rest glucidic decelabil și sînt formate dintr-un singur lanț polipeptidic sau din mai multe subunități polipeptidice. Rolul porțiunii glucidice nu este complet elucidat: ar putea acționa pentru stabilizarea structurii tridimensionale a glicoproteinelor sau ca un marker biochimic, care prin interacțiune cu o moleculă-purtător sau cu un receptor asociat cu membrana ar facilita transportul proteinei în mediul extern (Eylar, 1965). Unele exoproteine, ca, de exemplu, *penicilinaza legată de membrană* de la *B. licheniformis*, constituie o fosfolipoproteină, care se deosebește de enzima solubilă respectivă *(exopenicilinaza)* prin prezența unui lanț adițional fosfolipopeptidic, la capătul aminoterminal.

Aparent, producerea de exoproteine adevărate este o caracteristică a bacteriilor Gram-pozitive, rar întîlnită la cele Gram-negative. În realitate, la bacteriile Gram-negative cele mai multe enzime sînt reținute în spațiul periplasmatic (deci în afara membranei plasmatice), putînd fi eliberate în mediu numai după conversia celulelor la protoplaști. Ca urmare, diferențele dintre bacteriile Gram-pozitive și cele Gram-negative nu țin de capacitatea lor diferită de a sintetiza și exporta proteinele prin membrană, ci de natura fizicochimică a peretelui celular.

Exoproteinele produse de celulele eucariote (fungi, celule vegetale și animale) sînt, în mod obișnuit, molecule glicoproteice relativ mari, care conțin legături disulfidice (—S—S—) și, ca urmare, au o mai mare rigiditate, datorită căreia sînt mai greu exportate din celula în care au fost sintetizate (Eylar, 1965).

Rolul exoproteinelor microbiene. Unele exoproteine (proteaze, nucleaze, enzime litice ale peretelui celular) au și un substrat de acțiune celular și sînt implicate în diferite procese fiziologice, ca sporogeneza, transformarea genetică mediată de ADN, reînnoirea și creșterea peretelui celular etc. Cele mai multe însă, sînt lipsite de un substrat de acțiune în celulă și se comportă ca enzime care degradează polimerii din mediu, aprovizionînd celula cu nutrienți asimilabili. Exoproteinele au o mare importanță industrială, datorită faptului că se pot acumula masiv în mediul de cultură, iar obținerea și purificarea lor sînt mult simplificate. În ultimii ani, au fost obținute, prin tehnici genetice, celule care exportă anumite proteine intracelulare cu importanță industrială (Silvâhi și colab., 1977).

MECANISMELE DE SECREȚIE ALE EXOPROTEINELOR

Deși procesul de biosinteză a proteinelor este bine cunoscut la nivel molecular, multe aspecte ale secreției exoproteinelor microbiene se bazează pe date experimentale contradictorii.

SECREȚIA PROTEINELOR EXTRACELULARE LA MICROORGANISMELE EUCARIOTE

Procesul de secreție a proteinelor la microorganismele eucariote este puțin studiat și limitat la cîteva specii ca: *Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae* (Matile, 1965, 1971; Lampen, 1972), *Tetrahymena* și *Paramecium* (Satir și colab., 1975).

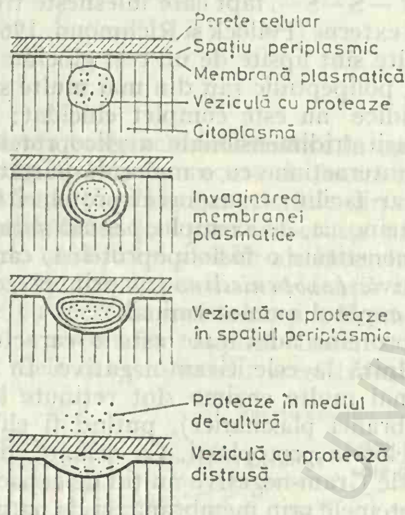


Fig. 149. — Schema secreției proteazelor la *Neurospora crassa* (după Matile, din Weide, 1979).

Fig. 149 prezintă fazele secreției proteazelor la *N. crassa*, la care enzimele sintetizate la nivelul reticulului endoplasmic rugos migrează spre periferia celulei, în interiorul unor mici vezicule, sînt acoperite de o invaginare a membranei plasmatice și apoi transferate în spațiul periplasmic unde învelișul veziculei este degradat și moleculele de proteaze trec libere în mediu prin peretele celular care se comportă ca o sită (rețea) permeabilă (Matile, 1965).

La levura *S. cerevisiae*, unele enzime sintetizate în cursul creșterii sînt transportate în mugurele format pentru multiplicare — probabil în interiorul unor mici vezicule —, fiind eliberate la apexul mugurelui și încorporate în peretele celular pe cale de dezvoltare (Matile, 1971; Lampen, 1972). Cele mai ample studii referitoare la secreția exoproteinelor din celulele eucariote au fost efectuate aproape invariabil pe celule secretoare animale, la care există în mod evident o populație de ribosomi legată de fața citoplasmatică a membranelor reticulului endoplasmic și alta de ribosomii liberi în citoplasmă („solubili").

La bacterii, situația este mai complicată datorită dimensiunilor mici, „împachetării" dense a ribosomilor în celulă și lipsei sistemului membranar intern, care împiedică demonstrarea vizuală a existenței celor două categorii de ribosomi.

Palade (1955) a sugerat că în celulele eucariote, ribosomii legați de membrane ar reprezenta sediul sintezei proteinelor destinate a fi secretate, iar ribosomii liberi ar asigura sinteza proteinelor citoplasmatice (neexportabile). În cazul ribosomilor legați de membranele reticulului endoplasmic

prin subunitatea lor mare, lanțul polipeptidic este „descărcat" vectorial în compartimentul intraluminal al reticulului endoplasmatic (Redman, Siekevitz și Palade, 1966; Sabatini, Tashiro și Palade, 1966).

Ulterior, s-a consolidat concepția că secreția exoproteinelor de către microorganismele eucariote reprezintă doar un caz particular al procesului studiat la celulele animale, cunoștințele respective putînd fi, în mare măsură, extrapolate la această categorie de microorganisme*). De aceea, vom prezenta sintetic mecanismul secreției proteinelor din celulele eucariote, în general.

Secreția exoproteinelor corelată cu traducerea informației genetice. Sinteza riguros selectivă a proteinelor intracelulare pe ribosomii liberi și a celor exportabile pe cei „legați" de membrane pune două probleme majore, după modul în care celula eucariotă dirijează moleculele individuale de ARNm, fie spre ribosomii liberi, fie spre cei legați, respectiv modul cum „decide" care proteine rămîn în celulă și care vor fi exportate.

Ipoteza secvenței „semnal". Blobel și Dobberstein (1971), precum și Blobel și Sabatini (1975) au demonstrat că ribosomii legați de reticulul endoplasmic nu se deosebesc cu nimic de cei liberi și derivă din aceștia. În schimb, moleculele de ARNm, care codifică informația necesară pentru sinteza proteinelor secretate, poartă o secvență neobișnuită de codoni, lungă de ~75 de baze *(codonii semnal)*, localizată imediat la dreapta codonului de inițiere a biosintezei (fig. 150). Această secvență este absentă la moleculele de ARNm

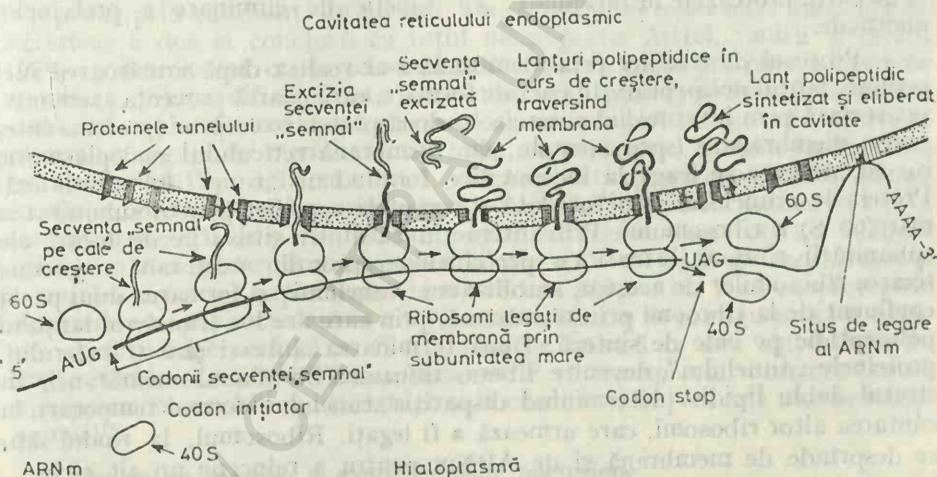


Fig. 150.—Transferul proteinelor prin membrana reticulului endoplasmic al microorganismelor eucariote, după ipoteza secvenței „semnal" (după Berkaloff, 1981).

care codifică proteinele citoplasmatice. Sinteza proteinelor „exportabile" începe, ca și aceea a proteinelor citoplasmatice, pe ribosomii liberi, dar spre deosebire de acestea, începutul unui polipeptid destinat să fie secretat este

---

*) Fungii filamentoși fac probabil excepție. Deși puțin studiată, secreția exoproteinelor pare să fie diferită, în cazul lor, nu numai în raport cu celulele animale, ci chiar de la un grup de fungi la altul (Gosh, 1978).

constituit dintr-o secvență particulară, de aproximativ 16—25 de aminoacizi— secvența „semnal" — situată la capătul aminoterminal, rezultată din traducerea codonilor semnal.

Numeroase fapte experimentale demonstrează existența unei corelații între sinteza și secreția proteinelor, în sensul că cele două procese se fac simultan: în timp ce începutul lanțului polipeptidic traversează membrana celulară, restul polipeptidului este sintetizat, în continuare, la nivelul ribosomului legat, prin traducerea informației din ARNm *(transfer corelat cu traducerea genetică*— „co-translational secretion"). Proteinele exportabile sînt sintetizate sub forma unor precursori mai lungi, deoarece au la extremitatea aminoterminală o secvență adițională corespunzînd secvenței „semnal". După transfer, această secvență este eliminată sub acțiunea unei enzime specifice — semnal peptidaza sau semnalaza („signalase"), fapt care face ca, în forma sa definitivă, proteina secretată activă să fie mai scurtă cu ~ 20 de aminoacizi decît produsul primar al traducerii. Îndepărtarea secvenței „semnal" reprezintă un mecanism molecular foarte important atît pentru activitatea enzimei, cît și pentru protecția celulei producătoare, deoarece: — plierea corectă a lanțului polipeptidic și formarea structurii spațiale a enzimei active necesită eliminarea secvenței „semnal"; — cînd din diferite motive, fixarea ribosomilor de membrana celulară nu are loc, proteina nu mai este transferată prin membrană și rămîne în citoplasmă, unde eliminarea secvenței „semnal" nu mai are loc. În acest caz, plierea proteinei se face incorect, fapt care are drept urmare distrugerea ei de către proteazele intracelulare, cu funcție de eliminare a proteinelor anormale.

Procesul de transfer prin membrană s-ar realiza după următoarea succesiune: lanțul polipeptidic în curs de formare, care poartă secvența „semnal", se asociază prin intermediul acesteia cu două proteine-receptor (proteine integrate) membranare (spre exemplu, din membrana reticulului endoplasmatic rugos), de care se leagă la început lax, formînd un „tunel" în membrană. Proteinele „tunelului" sînt totodată și receptori specifici pentru subunitatea mare(60 S) a ribosomului. Prin interacțiunea dintre situsurile de legare ale subunității ribosomale mari cu proteinele-receptor din membrană, se produc fixarea ribosomilor de acestea, stabilizarea „tunelului" și formarea unui pasaj confluent de la ribosomi prin membrană, prin care are loc transferul lanțului polipeptidic pe cale de sinteză. După terminarea sintezei și a transferului, proteinele „tunelului", devenite libere, difuzează în planul membranei, în stratul dublu lipidic (determinînd dispariția „tunelului" format temporar), în căutarea altor ribosomi, care urmează a fi legați. Ribosomul, la rîndul său, se desprinde de membrană și de ARNm pentru a reîncepe un alt ciclu.

Prin acest mecanism, exoproteinele ajung în cavitățile reticulului endoplasmatic, ale cărui membrane delimitează unul sau mai multe spații închise („cisterne"). De la acest nivel, ele sînt dirijate — printr-un mecanism încă controversat — spre aparatul Golgi, unde sînt „prelucrate" în continuare și modificate structural (de exemplu, prin adiția grupărilor glucidice) și final „împachetate" în vezicule de secreție delimitate de membrane, care migrează spre periferia celulei. În cele din urmă are loc fuziunea lor — dependentă de Ca^{2+} — cu membrana plasmatică și eliberarea conținutului la exterior prin exocitoză (pinocitoză inversă). Procesul descris permite stocarea enzimelor

extracelulare, „prelucrarea" și „maturarea" structurii lor chimice, precum și protecția celulei față de efectele potențial nocive ale enzimelor hidrolitice (Priest, 1983).

Sursa de energie pentru propulsarea proteinei prin membrană este încă necunoscută (Priest, 1983). După ipoteza secvenței „semnal", energia necesară pentru transfer este furnizată de însăși procesul de creștere a lanțului polipeptidic în ribosomi. Alte surse alternative ar putea fi reprezentate de: 1) plierea lanțului hidrofil pe fața externă a membranei, însoțită de „tragerea" polipeptidului prin membrană; 2) așezarea ribosomului pe membrană, în așa fel încît lanțul trece direct la exterior și 3) intervenția unei structuri organizate membranare, care interacționează cu lanțul polipeptidic, mobilizîndu-l, folosind energia metabolică.

SECREȚIA PROTEINELOR EXTRACELULARE LA BACTERII

În condiții corespunzătoare de creștere, cele mai multe bacterii sintetizează și secretă exoproteine în tot cursul ciclului de creștere, deși, în multe cazuri, acest proces se realizează mai intens în celulele aflate în fază staționară. Sinteza lor este influențată, cel puțin parțial, de concentrația nutrienților individuali în mediul extracelular. Cele mai multe dintre enzimele studiate sînt supuse controlului prin mecanisme de inhibiție prin produs final și / sau de represie prin catabolit. În ultimii ani, studiul secreției unor exoproteine bacteriene a dus la concluzii cu totul neașteptate. Astfel, Smith și colab. (1979) au demonstrat că, în cele mai multe cazuri, unele proteine bacteriene (α-amilaza, toxina difterică etc.) „se strecoară" prin membrana plasmatică pe măsură ce sînt formate și că sinteza lor s-ar face virtual exclusiv la nivelul polisomilor legați de membrane, în timp ce proteinele citoplasmatice sînt sintetizate numai pe polisomii liberi. Aceste observații au dus la concluzia că secreția exoproteinelor s-ar realiza în mod similar în celulele animale ca și în cele procariote (Davis și Tai, 1980). În sprijinul acestor observații s-a adăugat faptul că o mare parte din ribosomii celulari (~35—50 %) la *B. megaterium* și *B. amyloliquefaciens)* apar legați de membrana plasmatică și că exoproteinele bacteriene nu apar niciodată în citoplasmă, cel puțin în configurația lor naturală, ceea ce sugerează că ar fi secretate pe măsură ce sînt sintetizate. În sfîrșit, Silvâhi și colab. (1977) au demonstrat că transportul transmembranar al exoproteinelor este condiționat, ca și la eucariote, de prezența unei secvențe „semnal".

Modele de secreție a exoproteinelor bacteriene

Modelul lui Both și Mc Innes (1972), elaborat în acord cu datele obținute la eucariote consideră că transferul exoproteinelor bacteriene ar fi riguros corelat cu sinteza lor *(transfer corelat cu traducerea genetică)* și că s-ar desfășura după o secvență similară celei descrise la eucariote, cu singura deosebire că la bacterii fixarea ribosomilor se face pe fața citoplasmatică a membranei plasmatice, iar transferul direct prin structura acesteia. Procesul de secreție ar fi facilitat de faptul că secvențele „semnal" ale diferitelor proteine exportabile ar fi identice sau ar avea măcar un grad mare de omologie, fapt care ușurează recunoașterea lor de aceleași proteine-purtător de membrană.

Dovezi privind existenţa secvenţei „semnal" la bacterii. Experimental s-a demonstrat că proteinele periplasmice, ca şi cele localizate în membrana externă a peretelui celular sînt sintetizate *in vitro* sub forma unor precursori, mai mari cu cîteva mii de daltoni decît produsul final (Randall, 1978). Existenţa secvenţei „semnal" care condiţionează calitatea de proteină exportabilă a fost demonstrată însă, în mod indubitabil, prin tehnici genetice de către Silvâhi şi colab. (1977). Este ştiut că, proteina *lam B* de la *E. coli*, avînd, pe lîngă funcţia de proteină-receptor de fag, şi funcţia de a transporta anumiţi nutrienţi prin membrana externă a peretelui celular, este situată la nivelul acestei structuri (respectiv extracelular). În cazul tulpinilor de *E. coli* care au suferit modificări mutaţionale (schimbarea aminoacidului serină cu fenilalanină, în poziţia 154 a polipeptidului), produsul proteic al genei respective nu mai este exportat şi, ca urmare, se acumulează în citoplasmă. El este mai lung decît proteina *lam B* normală din membrana externă, deoarece conţine şi secvenţa „semnal" nefuncţională (modificată prin mutaţie) (fig. 151). În acelaşi timp, datorită caracterului polifuncţional al proteinei *lam B*, mutaţia suprimă capacitatea *E. coli* de a transporta maltoza şi îi conferă rezistenţă la fag.

Prezenţa şi rolul secvenţei „semnal" au fost demonstrate şi indirect prin experienţele de fuziune a genelor. S-a dovedit astfel, că o enzimă normal intracelulară — β-galactozidaza — poate fi exportată în membrana externă a peretelui celular dacă gena care o codifică (gena *z*) este legată cu o porţiune suficient de mare (~ 2/3 sau peste ~ 600 de nucleotide) situată la începutul genei *lam B*, al cărui produs este extracelular. În cazul în care se leagă cu o porţiune mai mică din gena *lam B* (spre exemplu, numai ~1/2), secreţia proteinei nu are loc decît parţial: ~ 60% rămîne în citoplasmă, ~20% rămîne în membrana plasmatică şi doar 20% este exportată în membrana externă (fig. 152). Experienţa demonstrează că numai secvenţa „semnal" situată la începutul polipeptidului, singură, nu conţine, totalitatea „informaţiei" necesară pentru a asigura transportul moleculei întregi prin membrană. Transferul integral este condiţionat de prezenţa unei informaţii suplimentare, înscrisă probabil într-o regiune situată între mijlocul şi cele 2/3 ale genei *lam B*, avînd rolul de a asigura continuarea transferului şi trecerea proteinei integrale prin membrana celulară (Silvâhi şi colab., 1977).

În sfîrşit, trebuie menţionată prezenţa „semnalazelor" şi la bacterii. Precursorii unor exoproteine de legare ale arabinozei şi maltozei sînt transformaţi în proteine active, prin excizia secvenţei „semnal" *in vitro* de o enzimă care poate fi extrasă din membrana externă cu Triton-X-100 (Randall, 1978; Priest, 1983).

Unele cercetări de inginerie genetică au demonstrat că *E. coli*, modificată genetic prin tehnica ADN recombinant pentru a face sinteza de ovalbumină, exportă această proteină prin membrana plasmatică, fără a fi nevoie ca gena respectivă de tip eucariot să fie cuplată cu o genă bacteriană destinată secreţiei din celulă. Această descoperire este importantă deoarece demonstrează că în tehnicile de inginerie genetică bacteriană nu este necesară, cel puţin în unele cazuri, cuplarea de gene menite să asigure exportul produsului proteic (Fraser şi Bruce, 1979). Ea sugerează că secvenţele de codoni „semnal" din ARNm, respectiv secvenţele de aminoacizi „semnal" din structura proteinelor extracelulare, ar fi identice la diferitele celule eucariote şi procariote (Schwartz, 1979). Secvenţa „semnal" ar constitui, după Schwartz (1979), un fel de „număr

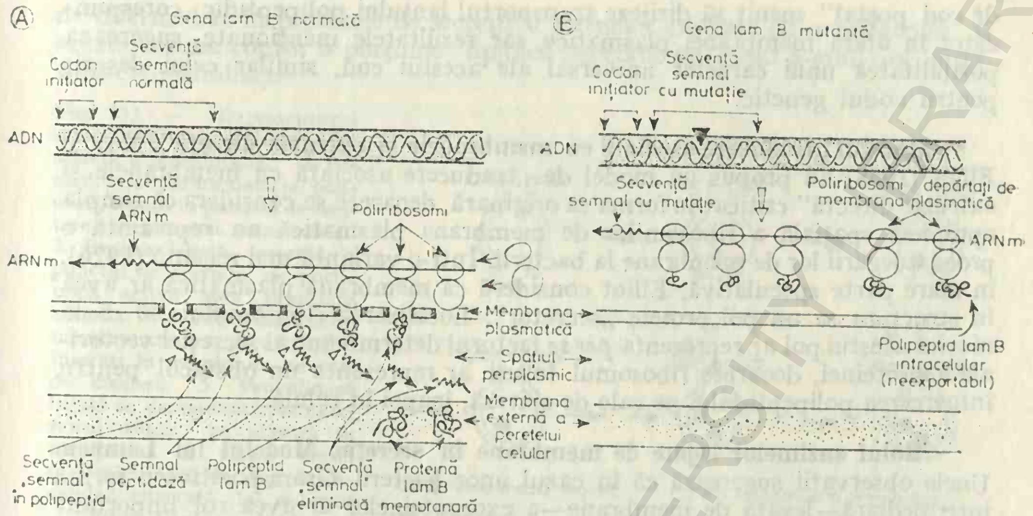


Fig. 151. — Schema experimentelor care au demonstrat necesitatea prezenței unei secvențe „semnal" la începutul genelor care codifică proteinele extracelulare la *E. coli*. A. Gena *lam B* normală transcrisă la ARNm *lam B* cu secvența „semnal" intactă este tradusă la nivelul polisomilor atașați de membrana plasmatică. Secvența „semnal" este eliminată în cursul trecerii prin membrana plasmatică de semnal peptidază, după care proteina *lam B* este fixată la nivelul membranei externe a peretelui celular. B. Gena *lam B* cu o mutație la nivelul secvenței „semnal" transcrisă la ARNm cu secvență „semnal" nefuncțională este tradusă la un polipeptid care nu permite atașarea ribosomilor de membrană. Proteina *lam B* mutantă rămîne intracelulară. Mutația suprimă capacitatea *E. coli* de a transporta maltoză și conferă rezistență la fag.

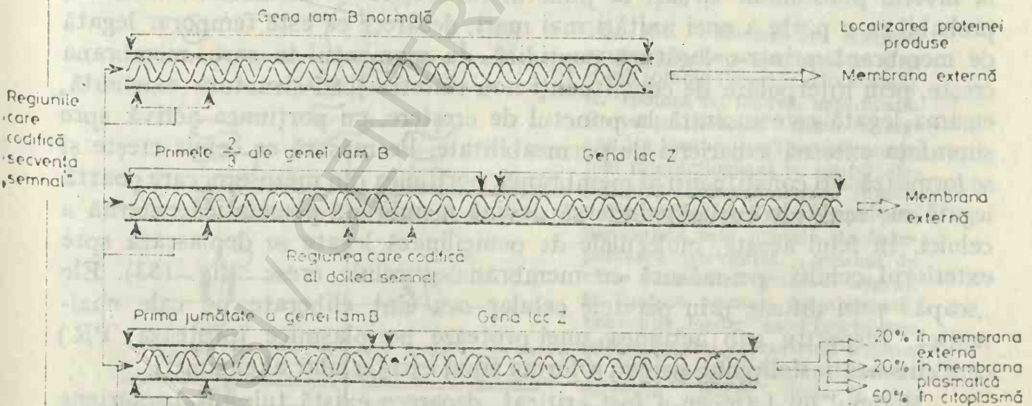


Fig. 152. — Proteinele intracelulare (β-galactozidaza) pot fi secretate în membrana externă a *E. coli* după fuzionarea genei care le codifică (gena Z), cu cele două secvențe semnal ale genei *lam B*. Proteina produsă de gena *lam B* ca și proteina hibridă formată prin fuzionarea genei *lac Z* cu primele 2/3 ale genei *lam B* sînt secretate în membrana externă a peretelui celular. Fuzionarea genei *lac Z* numai cu prima jumătate a genei *lam B* are ca rezultat producerea unei proteine hibride, care rămîne 60% în citoplasmă, 20% în membrana plasmatică și 20% în membrana externă.

de cod poştal" menit să dirijeze transportul lanţului polipeptidic corespunzător în afara membranei plasmatice, iar rezultatele menţionate sugerează posibilitatea unui caracter universal ale acestui cod, similar celui descris pentru codul genetic.

Modelul „traducere asociată cu membranele şi extruzie directă". May şi Elliot (1968) au propus un model de „traducere asociată cu membranele şi extruzie directă" criticat în forma sa originară, deoarece se considera că simpla apropiere spaţială a ribosomilor de membrana plasmatică nu reprezintă o probă a legării lor de membrane la bacterii. Într-o variantă mai recentă (1976), în mare parte speculativă, Elliot consideră că membrana plasmatică ar avea în structura sa un pol proteic „secretor". Localizarea ribosomului 50 S la nivelul acestui pol ar reprezenta *per se* factorul determinant al secreţiei vectoriale a proteinei, deoarece ribosomul însuşi ar reprezenta un obstacol pentru întoarcerea polipeptidului pe cale de sinteză, înapoi în celulă.

Rolul enzimelor legate de membrane în secreţie. Modelul lui Lampen. Unele observaţii sugerează că în cazul unor bacterii Gram-pozitive o formă intermediară—legată de membrane—a exoproteinelor ar avea rol important în secreţie. Cazul cel mai mult studiat este cel al penicilinazei de la *Bacillus licheniformis*, la care această enzimă este prezentă sub două forme: *penicilinaza legată de membrană*, hidrofobă (M ~ 33 000 dal), avînd un segment fosfatidilserină, care include ~ 25 de aminoacizi, localizat între secvenţa „semnal" şi porţiunea catalitică a enzimei, şi *penicilinaza hidrofilă* (M ~ 29 000 dal), prezentă liberă în lichidele de cultură. La pH 7,0, penicilinaza este găsită ~ 50 % secretată în mediu, ~ 25 % asociată cu membrana plasmatică şi ~ 25 % în spaţiul periplasmic (Priest, 1977).

După Lampen (1972, 1978), secreţia acestei enzime ar fi asociată cu creşterea membranei celulare şi cu activitatea mezosomilor. Enzima se formează la nivelul polisomilor situaţi la punctul de creştere a membranei celulare, probabil ca o parte a unei unităţi mai mari, deoarece ea este temporar legată de membrană printr-o legătură peptidică. În momentul în care membrana creşte, prin interpolare de constituenţi nou sintetizaţi în structura existentă, enzima legată este inserată la punctul de creştere, cu porţiunea activă spre suprafaţa externă a barierei de permeabilitate. Pe măsură ce celula creşte şi se formează alţi constituenţi ai membranei, porţiunea din mezosom, care poartă legată molecula de enzimă, tinde să devină membrană plasmatică externă a celulei. În felul acesta, moleculele de penicilinază legate se deplasează spre exteriorul celulei, pe măsură ce membrana şi celula cresc (fig. 153). Ele „scapă" prin difuzie prin peretele celular sau sînt eliberate pe cale enzimatică, respectiv sub acţiunea unei proteaze periplasmice (proteaza PR) care clivează fosfolipidul, pentru a forma tipul extracelular al enzimei.

Modelul lui Lampen a fost criticat, deoarece există tulpini bacteriene constitutive, care nu au mezosomi dezvoltaţi şi care continuă să secrete penicilinază. Datele mai noi sugerează însă, că fenomenul nu este limitat la penicilinază, ci ar avea un caracter mai general. Cele două tipuri de enzime, legate de membrane şi solubile, au fost descrise şi în cazul α-amilazei şi al proteazelor alcaline şi neutre la *B. subtilis*, fapt care pledează pentru funcţia

de intermediar în procesele de secreţie a formelor asociate cu membranele. Şi aceste enzime conţin o porţiune lipidică asociată (în cazul α-amilazei, fosfatidil-etanolamina).

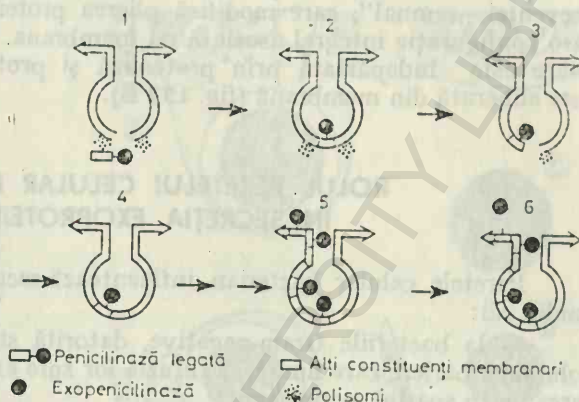


Fig. 153. — Reprezentarea schematică a mecanismului de secreţie a penicilinazei. 1. Penicilinaza nou formată pe polisomi, legată la punctul de creştere a membranei, pe mesosom. 2. Enzima legată, inserată la punctul de creştere, cu porţiunea activă spre suprafaţa externă. 3. 4. Alţi constituenţi membranari nou formaţi sînt inseraţi în membrana pe cale de creştere. 5. Penicilinaza legată se deplasează spre exteriorul celulei, pe măsură ce membrana şi celula cresc. 6. Penicilinază de tip extracelular eliberată la exterior (după Lampen, 1965).

Ipoteza amorsei membranare („membrane trigger hypothesis"). După ipotezele anterioare, enzimele legate de membrane şi cele extracelulare nu apar niciodată în citoplasma celulei. Au fost descrise însă şi excepţii: *α-glicozidaza* unor specii termofile de *Bacillus*, ca şi toxina holerică se acumulează în celule înainte de a fi exportate în mediu (Nichols, 1980). Sinteza lor are loc, probabil, la nivelul ribosomilor solubili. După Blobel (1979), în acest caz, este posibil ca secvenţa „semnal" a polipeptidului complet sintetizat să reacţioneze cu o proteină-receptor membranară, deschizînd un por, care permite trecerea lanţului prin membrană. Secreţia este însoţită de deplierea lui în cursul transferului, urmată de repliere după ce a ajuns la exterior (fig. 154 A). Translocaţia poate fi întreruptă de o secvenţă internă („stop") din structura proteinei care duce la formarea unei proteine legată de membrană.

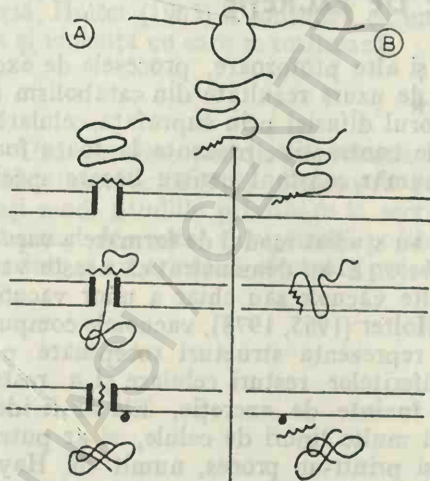


Fig. 154. — Mecanismul secreţiei exoproteinelor sintetizate pe ribosomii solubili (liberi în citoplasmă). A. Ipoteza lui Blobel, modificată. Secvenţa „semnal" (linia în zig-zag) a lanţului polipeptidic complet interacţionează cu proteinele-receptor membranare (barele negre verticale). Translocaţia prin membrană este urmată de îndepărtarea secvenţei „semnal" de către semnalază (punctul negru). B. Ipoteza amorsei membranare. Secvenţa „leader" modifică plierea polipeptidului, favorizînd legarea de membrană. După transfer, secvenţa „leader" (linia în zig-zag) este îndepărtată de o protează (punctul negru) (după Priest, 1983).

Wickner (1979) propune „ipoteza amorsei membranare" bazată pe proprietatea unui strat dublu lipidic membranar de a amorsa plierea unui polipeptid într-o formă asociată cu membrana. Polipeptidul complet sintetizat pe ribosomii liberi ar purta o secvență „conducătoare" („leader") analogă secvenței „semnal", care modifică plierea proteinei în așa fel încît aceasta ia o configurație integral asociată cu membrana. Ulterior, secvența conducătoare este îndepărtată prin proteoliză și proteina, devenită funcțională, este eliberată din membrană (fig. 154 B).

ROLUL PERETELUI CELULAR BACTERIAN ÎN SECREȚIA EXOPROTEINELOR

Peretele celular bacterian influențează secreția exoproteinelor pe mai multe căi:

— la bacteriile Gram-negative, datorită structurii sale complexe, are rolul unei bariere care limitează difuzia lor spre exterior, determinînd acumularea lor în spațiul periplasmic;

— protejează de clivarea proteolitică exoproteinele care străbat membrana plasmatică într-o conformație sensibilă la acțiunea proteazelor și diferită de cea a enzimei active (Sanders, 1975; Bettinger și Campen, 1975);

— joacă rol în „prelucrarea" exoproteinelor, corelată cu apariția unor modificări conformaționale, în drumul lor spre mediul extern și în realizarea modificărilor care urmează traducerii informației genetice, sub acțiunea unor enzime, ca deformilaza și peptidazele.

PROCESELE DE EXCREȚIE

Studiate, în special, la amoebe și alte protozoare, procesele de excreție se realizează pentru unele materiale de uzură rezultate din catabolism (CO_2, uree, acid uric, NH_4^+ etc.), cu ajutorul difuziei prin suprafața celulară, iar pentru excesul de apă prin vacuolele contractile, prezente la toate formele care trăiesc în apele dulci, într-un număr constant pentru fiecare specie, în condiții normale.

Andresen și Holter (1945, 1965) au studiat modul de formare a *vacuolelor compuse* la amoeba gigantă *Chaos chaos*. Ei au demonstrat că aceste vacuole se formează prin coalescența unor alte vacuole sau chiar a unor vacuole cu organite celulare nevacuolare. După Holter (1965, 1978), vacuolele compuse — numite și *vacuole de defecare* — ar reprezenta structuri receptoare pentru colectarea produșilor de uzură, a diferitelor resturi celulare și a resturilor nedigerabile din vacuolele digestive înainte de excreție. Ele ar fi identice cu lizosomii compuși, descriși la mai multe tipuri de celule, și ar putea lua naștere nu numai prin fuziune, ci și printr-un proces, numit de Hayward (1963) *sechestrare*. Cel puțin la amoebe și alte protozoare, aceste vacuole sînt, în cele din urmă, expulzate prin procesul de defecare, ce se realizează într-o serie de etape succesive (Holter, 1965); vacuola este deplasată prin mișcări citoplasmatice violente spre plasmalemă și este, de regulă, împinsă spre extremi-

tatea unui mic pseudopod (fig. 155). Cînd membrana vacuolară și plasmalema vin în contact strîns una cu cealaltă are loc fuziunea membranelor în așa fel încît, probabil, datorită forțelor de tensiune superficială membrana vacuolară

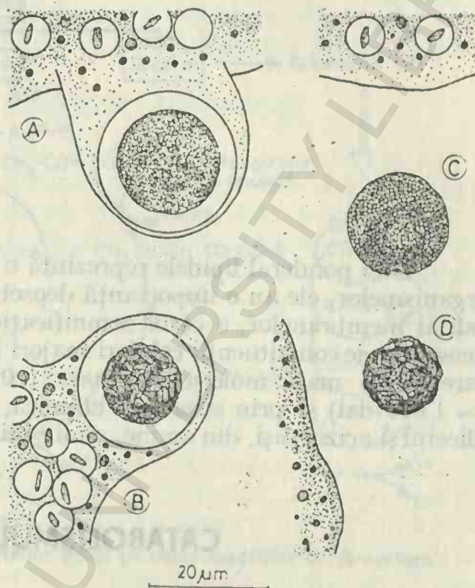


Fig. 155. — Etapele procesului de excreție la amoeba gigantă *Chaos chaos*. **A.B.** Două vacuole de defecare la extremitatea unor pseudopode (A, vacuolă digestivă; B, vacuolă de coalescență conținînd un pachet de cristale). **C.D.** Cele două vacuole au fost expulzate și se găsesc libere în mediu (după Holter, 1965).

ajunsă la suprafață este desprinsă, iar conținutul său este expulzat foarte rapid, fără expunerea concomitentă a citoplasmei la un contact cu exteriorul. Evidențiind asemănările procesului de defecare la protozoare cu pinocitoza inversă, Holter (1965) îl consideră ca un caz special de exocitoză, prin rapiditatea și violența cu care se realizează.

*

Una din descoperirile importante ale biologiei moleculare este aceea că, practic, toate celulele își desfășoară procesele biochimice fundamentale în același mod. Studiile privitoare la secreția proteinelor extracelulare întăresc acest punct de vedere și sugerează posibilitatea ca, în ultimă instanță, celulele procariote și eucariote să efectueze procesul de secreție în același mod (Glenn, 1976).

METABOLISMUL LIPIDELOR

Deși ponderal lipidele reprezintă o mică fracțiune din compoziția microorganismelor, ele au o importanță deosebită deoarece sînt constituenți universali ai membranelor, a căror semnificație biologică este esențială. Lipidele se deosebesc de constituenții celulari majori (acizi nucleici, proteine, polizaharide), care au o masă moleculară mare (10^4—10^8), prin dimensiunile lor mici (~ 1 000 dal) și prin structura chimică, uneori complexă, formată, pe lîngă glicerol și acizi grași, din amine, aminoacizi, glucide, aldehide sau hidrocarburi.

CATABOLISMUL LIPIDELOR

Microorganismele utilizează lipidele numai după ce au fost hidrolizate de lipazele extra- sau intracelulare în unitățile componente. Lipazele sînt enzime relativ nespecifice și de aceea pot hidroliza lipide care conțin acizi grași cu catene de diferite lungimi. Spre exemplu, lipazele de la *B. megaterium* acționează asupra legăturilor esterice din lipide ce conțin acizi grași cu 6 pînă la 20 de atomi de carbon. Trigliceridele, esteri ai glicerolului cu acizi grași, sînt scindate inițial la glicerol și acizi grași. După fosforilare, glicerolul sub formă de glicerol-3-P poate lua calea EMP și folosit pentru producere de ATP, iar acizii grași sînt oxidați pe căi caracteristice. Fosfolipidele avînd o structură mai complexă sînt hidrolizate sub acțiunea unor fosfolipaze specifice la glicerol, acizi grași și o serie de molecule de natură diferită ca etanol-amină, inozitol, serină, colină etc. Fosfolipazele A și B, cu acțiune similară lipazelor, scindează esterii acizilor grași, în timp ce fosfolipazele C și D atacă de asemenea legăturile ester fosfat, dar formează o categorie de enzime aparte.

Oxidarea acizilor grași. Acizii grași rezultați prin lipoliză sînt degradați oxidativ pînă la CO_2 și H_2O, cu eliberarea unei cantități mari de energie.

Calea principală de catabolism — β-oxidarea — a fost elucidată de Lynen (1952). Enzimele ciclului Lynen au fost evidențiate în mitocondrii la microorganismele eucariote, în timp ce la bacterii localizarea lor este încă incertă. Degradarea oxidativă necesită activarea acizilor grași sub acțiunea CoA, în prezența ATP ca sursă de energie. Complexul acil-CoA format posedă suficientă energie liberă pentru inițierea procesului de β-oxidare. Fragmentarea catenei acidului gras are loc printr-o succesiune de reacții de dehidrogenare, hidratare, dehidrogenare și scindare, prin care rezultă acetil-CoA și un nou

acid gras cu 2 atomi de C mai puţin. Procesul se repetă pînă la obţinerea de CO_2, H_2O şi acetil-CoA, care intră în ciclul ATC sau este convertit în hexoze şi alţi constituenţi celulari pe calea glioxilatului.

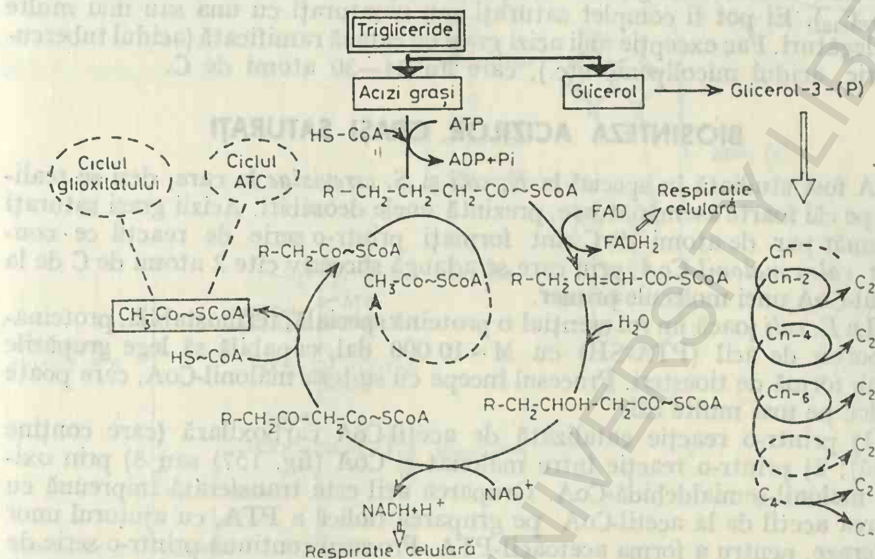


Fig. 156. — Schema catabolismului acizilor graşi pe calea reacţiilor de β-oxidare.

În ansamblu, procesul de β-oxidare, schematizat de Lynen sub forma unui helix, eliberează o mare cantitate de energie (fig. 156). Spre exemplu, oxidarea completă a acidului palmitic (C_{16}) duce la sinteza netă de 130 molecule de ATP, corespunzînd unei cantităţi de 910 kcal/moleculă gram de acid oxidat. Randamentul este superior celui realizat prin degradarea oxidativă a glucozei, dar aceasta este mai uşor accesibilă degradării şi de aceea este folosită preferenţial de celule pentru obţinerea energiei. În cazul acizilor graşi cu număr impar de atomi de C, ciclul de β-oxidare final produce acetil-CoA şi propionil-CoA, care este forma activă a propionatului. Or, este demonstrat că numeroase bacterii pot creşte pe propionat ca sursă de C şi de energie.

Procesele de α-oxidare şi de ω-oxidare reprezintă căi secundare, caracteristice celulelor vegetale şi, probabil, neîntîlnite la microorganisme.

BIOSINTEZA LIPIDELOR

Deşi nu le acumulează ca material de rezervă*), bacteriile conţin cantităţi importante de lipide sub formă de fosfolipide şi glicolipide în structura sistemelor membranare (membrana plasmatică, mezosomi, membrane fotosintetice etc.). Deşi trigliceridele sînt prezente în special la microorganismele eucariote, cele mai multe bacterii studiate au proprietatea de a le sintetiza.

---

*) Poli-β-hidroxibutiratul, component al aşa-numitelor incluziuni sau granule lipidice, nu este de natură lipidică.

Biosinteza lipidelor implică formarea componentelor lor majore (acizi grași, glicerol etc.). Acizii grași izolați de la microorganisme au predominant catene lineare foarte lungi, care conțin, de regulă, un număr par de atomi de $C(C_{12}—C_{18})$. Ei pot fi complet saturați sau nesaturați cu una sau mai multe duble legături. Fac excepție unii acizi grași cu catenă ramificată (acidul tuberculostearic, acidul micolipenic etc.), care au 24—30 atomi de C.

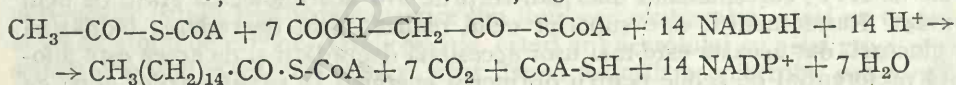
BIOSINTEZA ACIZILOR GRAȘI SATURAȚI

A fost studiată în special la *E. coli* și *S. cerevisiae* la care, deși se realizează pe căi foarte asemănătoare, prezintă unele deosebiri. Acizii grași saturați cu număr par de atomi de C sînt formați printr-o serie de reacții ce constituie *calea malonil-CoA*, prin care se adaugă succesiv cîte 2 atomi de C de la malonil-CoA unei molecule primer.

La *E. coli* joacă un rol esențial o proteină specială, termostabilă, proteina-transportor de acil (PTA-SH) cu $M \sim 10\,000$ dal, capabilă să lege grupările acil sub formă de tioesteri. Procesul începe cu sinteza malonil-CoA, care poate avea loc pe mai multe căi:

1) printr-o reacție catalizată de acetil-CoA carboxilază (care conține biotină); 2) printr-o reacție între malonat și CoA (fig. 157) sau 3) prin oxidarea malonil-semialdehidă-CoA. Gruparea acil este transferată împreună cu gruparea acetil de la acetil-CoA pe gruparea tiolică a PTA, cu ajutorul unor transferaze, pentru a forma acetoacil-PTA. Procesul continuă printr-o serie de reacții pînă la obținerea de butiril-PTA. Acesta se condensează cu o nouă moleculă de malonil-PTA și, printr-o secvență de reacții, se adaugă 2 atomi de C catenei de acid gras — acil. Urmează noi cicluri de reacții, care adaugă de fiecare dată 2 C, pînă cînd se obține acidul gras cu lungimea corespunzătoare (fig. 158).

În cazul obținerii palmitatului, reacția globală de sinteză este:



$$CH_3—CO—S\text{-}CoA + 7\,COOH—CH_2—CO—S\text{-}CoA + 14\,NADPH + 14\,H^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3(CH_2)_{14}\cdot CO\cdot S\text{-}CoA + 7\,CO_2 + CoA\text{-}SH + 14\,NADP^+ + 7\,H_2O$$

La *S. cerevisiae*, biosinteza acizilor grași saturați este condiționată de activitatea sistemului multienzimatic al acid gras sintetazei, format din 6 enzime grefate pe o proteină purtătoare de acil similară celei descrise în sistemele bacteriene (fig. 159).

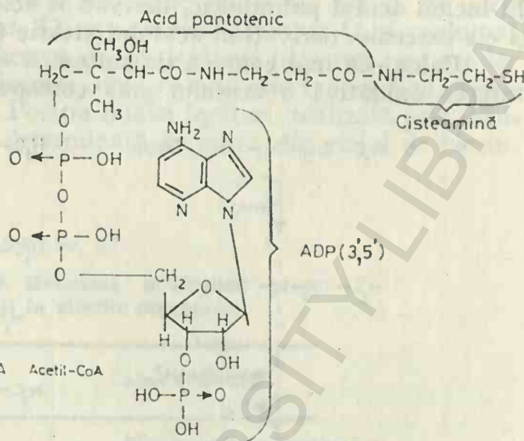
Sinteza este inițiată prin transferul restului acetil de la acetil-CoA la o grupare tiol periferică a proteinei și prin transferul restului malonil pe o grupare tiol centrală. Gruparea acetoacetil formată prin condensare rămîne legată de gruparea tiol centrală, unde au loc celelalte reacții pînă la formarea de butiril-PTA. Acesta este transferat pe gruparea tiol periferică, lăsînd gruparea tiol centrală liberă pentru a lega alt rest malonil, cu care procesul continuă.

Nu se cunosc factorii care determină limitarea lungimii catenei în cursul sintezei acizilor grași.

BIOSINTEZA ACIZILOR GRAȘI NESATURAȚI

Lipidele microorganismelor conțin, în proporții variabile, acizi grași nesaturați cu una sau mai multe duble legături. Acizii grași mononesaturați, care conțin o singură dublă legătură, sînt constituenți universali ai celulelor.

Fig. 157. — Structura CoA.



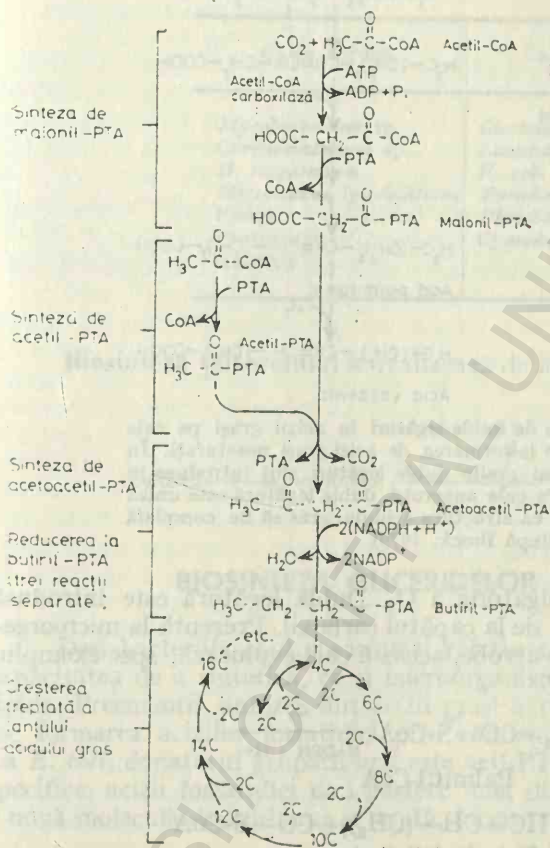


Fig. 158. — Sinteza acizilor grași prin adiția treptată a unor unități cu 2 C la malonil-CoA. PTA—proteină purtătoare de acid.

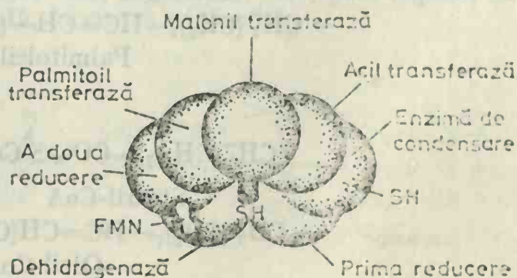


Fig. 159. — Structura complexului multienzimatic al acid-gras sintetazei izolat de la *Saccharomyces cerevisiae*.

Ei includ acidul palmitoleic, derivat al acidului palmitic (C_{16}), şi acizii oleic şi cis-vaccenic, derivaţi ai acidului stearic (fig. 160).

Calea cea mai comună de sinteză a acizilor graşi nesaturaţi este desaturarea oxidativă a acidului gras corespunzător, numită şi **calea aerobă**,

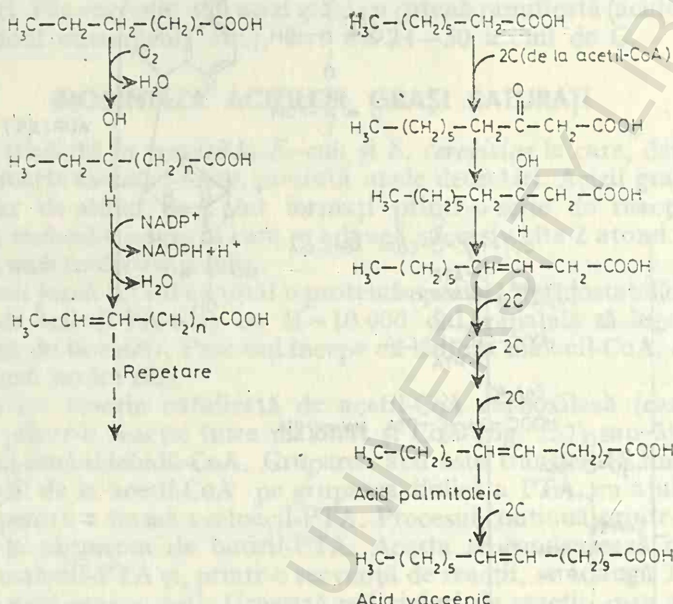
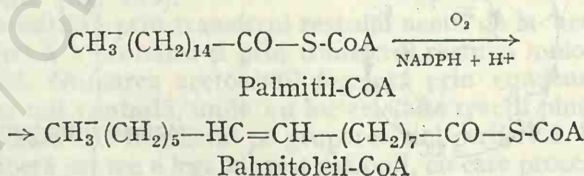


Fig. 160. — Introducerea de duble legături în acizii graşi pe cale aerobă sau anaerobă duce la formarea de acizi graşi nesaturaţi. În condiţii aerobe una sau mai multe duble legături sînt introduse în acidul gras preformat. Pe cale anaerobă, dubla legătură este unică şi este introdusă înainte ca structura acidului gras să fie completă (după Brock, 1979).

deoarece implică prezenţa obligatorie a O_2. Dubla legătură este introdusă totdeauna între atomii C_9 şi C_{10} de la capătul carboxil. Prezentă la microorganismele eucariote şi la bacteriile aerobe, această cale evoluează, spre exemplu, după reacţiile:

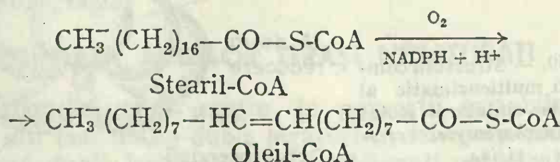


$$CH_3^- (CH_2)_{14}—CO—S\text{-}CoA \xrightarrow[NADPH\ +\ H^+]{O_2}$$

Palmitil-CoA

$$\rightarrow CH_3^- (CH_2)_5—HC{=}CH—(CH_2)_7—CO—S\text{-}CoA$$

Palmitoleil-CoA



$$CH_3^- (CH_2)_{16}—CO—S\text{-}CoA \xrightarrow[NADPH\ +\ H^+]{O_2}$$

Stearil-CoA

$$\rightarrow CH_3^- (CH_2)_7—HC{=}CH(CH_2)_7—CO—S\text{-}CoA$$

Oleil-CoA

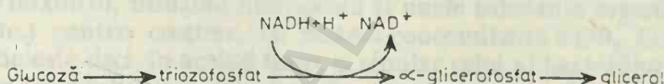
Calea anaerobă, urmată de toate bacteriile anaerobe, dar și de unele bacterii facultativ aerobe (tabelul nr. 32), nu necesită prezența O_2 și evoluează după un mecanism diferit. Introducerea dublei legături (desaturarea) are loc într-un stadiu mai precoce al biosintezei, cînd catena este incompletă, avînd în mod obișnuit 8—12 atomi de C. Poziția dublei legături, realizată prin dehidrogenarea grupării hidroxil, este determinată de etapa din ciclul de biosinteză în care s-a format.

Tabelul nr. 32

Distribuția căilor de biosinteză a acizilor grași mononesaturați la diferite organisme

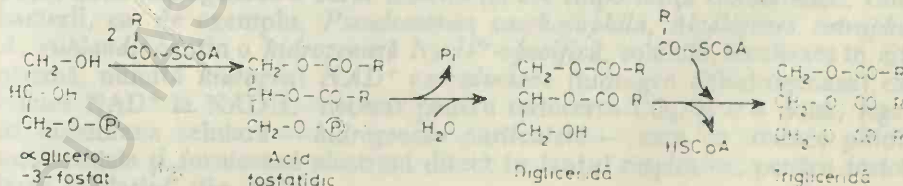
Calea aerobă	Calea anaerobă
Mycobacterium sp.	*Clostridium* sp.
Corynebacterium sp.	*Lactobacillus* sp.
B. megaterium	*E. coli*
Micrococcus lysodeikticus	*Pseudomonas* sp.
Fungi	*Photobacteria*
Protozoare	*Cyanobacteria*
Animale	

Biosinteza glicerolului se realizează de la glucoză pe calea:



BIOSINTEZA GLICERIDELOR (LIPOGENEZA)

Deși bacteriile conțin cantități relativ scăzute de gliceride, ele posedă capacitatea de a sintetiza, ca și microorganismele eucariote, această clasă de lipide. Precursorii sintezei sînt acizii grași activați și glicerol-3-P. Inițial are loc formarea acizilor fosfatidici prin condensarea acil-CoA cu glicerol-3-P. La *E. coli*, donatorul grupării acil este acil-PTA. Sub acțiunea unei fosfataze specifice, acizii fosfatidici dau naștere unei digliceride, care, prin cuplare cu o nouă moleculă de acid gras activată, formează trigliceride:



BIOSINTEZA GLICEROFOSFOLIPIDELOR

Are ca punct de plecare acidul fosfatidic, care este convertit în prezența citidintrifosfatului (CTP) în citidindifosfat digliceridă, precursorul comun al

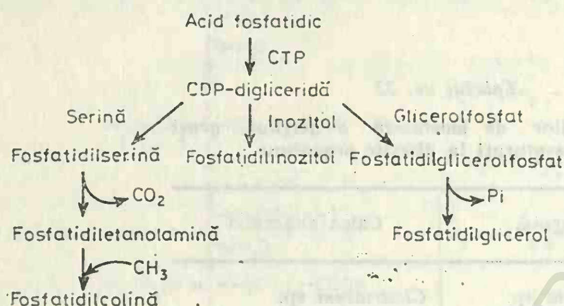


Fig. 161. — Reprezentarea schematică a căilor biosintezei glicerofosfolipidelor.

tuturor glicerofosfolipidelor sintetizate pe această cale (fig. 161). Glicerofosfolipidele au o importanță deosebită pentru biologia microorganismelor, datorită funcției lor de constituenți membranari și de transportori ai lipoproteinelor

BACTERIILE CARE OXIDEAZĂ HIDROGENUL

„Hidrogen-bacteriile" formează un grup bine definit din punct de vedere fiziologic, dar foarte diferit taxonomic, și considerat, ca urmare, drept cel mai heterogen dintre chemolitoautotrofele aerobe. Ele sînt caracterizate prin capacitatea de a utiliza hidrogenul gazos ca donator de electroni (avînd oxigenul ca acceptor de electroni) și de a fixa CO_2 pentru creștere. Delimitate în acest sens strict, bacteriile care oxidează aerob hidrogenul se deosebesc de alte bacterii (*Desulfovibrio, Methanobacterium autotrophicum, Clostridium aceticum, Acetobacter woodii* etc.), care au aceeași proprietate, dar sînt lipsite de capacitatea de a fixa autotrof CO_2 (Aragno și Schlegel, 1981).

Spre deosebire de majoritatea bacteriilor nitrificatoare, sulf și ferooxidante, hidrogen-bacteriile — cu o singură excepție — sînt facultativ chemolitotrofe, deoarece se pot dezvolta bine pe o largă gamă de substanțe organice simple, care le servesc ca donatori de electroni și ca sursă de C. Ele se pot dezvolta și mixotrof, utilizînd hidrogenul și unele substanțe organice (lactoza, fructoza etc.) pentru creștere, cu fixarea concomitentă a CO_2. Echipamentul lor enzimatic este deci, în același timp, și similar celui al bacteriilor heterotrofe aerobe, ceea ce explică proprietatea de a crește uneori chiar mai abundent heterotrof decît autotrof. Totdeauna însă ele păstrează, pe lîngă potențialul heterotrof, capacitatea de a obține energie prin oxidarea hidrogenului gazos și pe aceea de a sintetiza constituenții celulari prin asimilarea reductivă a CO_2, pe calea ciclului ribulozofosfatului (ciclul lui Calvin). Particularitatea distinctivă a bacteriilor care oxidează aerob hidrogenul și unicitatea proprietăților lor biologice rezidă, deci, în prezența constantă a capacității de a utiliza hidrogenul ca donator de electroni în aerobioză și de a folosi CO_2 ca unică sursă de carbon (Bowien și Schlegel, 1981; Aragno și Schlegel, 1981).

Particularitățile metabolice ale bacteriilor care oxidează hidrogenul sînt legate de prezența unor enzime — *hidrogenazele* — care diferă în funcție de localizarea lor în celulă și de natura acceptorului de hidrogen. Există cel puțin două hidrogenaze a căror distribuție are importanță taxonomică. Unele bacterii, ca, de exemplu, *Pseudomonas saccharophila, Alcaligenes eutrophus, A. ruhlandii* conțin o *hidrogenază NAD^+-specifică*, solubilă, localizată în citoplasmă, numită *hidrogen*: *NAD^+ oxireductaza* (hidrogen dehidrogenaza), care reduce NAD^+ la NADH, necesar pentru reducerea CO_2, și o a doua, legată de membrana celulară — *hidrogenaza particulată* — care nu reduce piridinnucleotidele și furnizează electroni direct în lanțul respirator, pentru fosforilarea oxidativă (fig. 162).

Majoritatea bacteriilor care oxidează hidrogenul conțin numai hidrogenaza particulată, ca unică enzimă activatoare de hidrogen (Schneider și Schlegel, 1977). În cursul metabolismului bacteriilor hidrogenotrofe, oxidarea

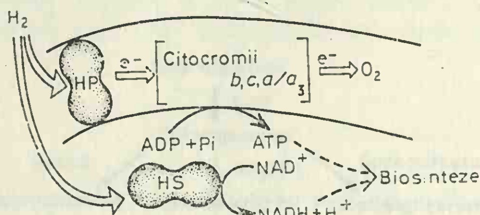
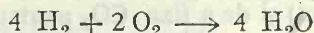
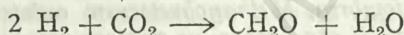


Fig. 162. — Funcționarea celor două hidrogenaze la *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas saccharophila* și *Ps. ruhlandii* (după Schlegel, 1976). HS—hidrogenaza solubilă; HP — hidrogenaza particulată.

H_2 la apă, produce suficient ATP pentru a permite sinteza de material celular ⟨CH_2O⟩, de la CO_2 și H_2O, după următoarele reacții:



$$4\,H_2 + 2\,O_2 \longrightarrow 4\,H_2O$$



$$2\,H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_2O + H_2O$$

Reacția globală: $6\,H_2 + 2\,O_2 + CO_2 \longrightarrow \langle CH_2O\rangle + 5\,H_2O$

Taxonomie. Particularitățile biochimice și fiziologice ale bacteriilor care oxidează hidrogenul nu sînt corelate cu cele taxonomice. Considerate inițial ca o grupare taxonomică unitară și descrise ca genul *Hydrogenomonas*, ele formează, în realitate, un grup foarte heterogen, alcătuit din mai multe specii, aparținînd unor grupări preexistente. Capacitatea de a crește autotrof pe seama hidrogenului și a CO_2 a fost evidențiată la numeroase specii izolate din natură sau provenite din colecțiile de culturi, dar cele mai multe sînt descrise pe criterii nevalidabile și taxonomia grupului — în curs de restructurare — necesită investigații suplimentare. Existența genului *Hydrogenomonas* a fost infirmată în determinatorul Bergey (Buchanan și Gibbson, 1974), pe baza datelor lui Davis și colab. (1969). Una din speciile caracteristice, încadrată ca *Pseudomonas ruhlandii*, s-a dovedit ulterior a fi *Alcaligenes ruhlandii*. După datele cele mai noi (Bowien și Schlegel, 1981; Aragno și Schlegel, 1981), bacteriile care oxidează hidrogenul pot fi grupate în trei categorii:

1) Grupul *bacteriilor hidrogenotrofe* (care oxidează hidrogenul aerob), format din ~ 28 de specii aparținînd la 15 genuri, are ca principali reprezentanți, pe lîngă *Alcaligenes eutrophus*, *A. paradoxus*, *A. ruhlandii*, *Pseudomonas facilis*, *Ps. flava*, *Ps. hydrogenovora*, *Ps. hydrogenothermophila*, *Ps. saccharophyla*, *Xantobacter autotrophicus*, *Nocardia autotrophica*, unele specii din genurile: *Aquaspirillum* sp., *Azospirillum*, *Microcyclus*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Paracoccus* etc.

Această mare diversitate taxonomică demonstrează că, sistemele enzimatice care asigură utilizarea hidrogenului și creșterea în aceste condiții sînt funcțional similare și operaționale la o gamă largă de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative.

2) Bacteriile care oxidează monooxidul de carbon (*carboxido-bacteriile*), care cresc folosind CO ca unică sursă de C și energie, se dezvoltă la fel de bine, sau uneori chiar mai bine, utilizînd CO_2 și hidrogenul. De aceea, cercetările recente justifică încadrarea lor în grupul mare al bacteriilor care oxidează aerob hidrogenul (Zavarzin, 1976, 1978; Bowien și Schlegel, 1981).

3) Al treilea grup, considerat în stadiul actual ca potențial apartenent acestui grup mare, este reprezentat de unele *Rhodospirillaceae* — bacterii fototrofe — și în special de *Rhodopseudomonas capsulata*, care crește în mediu mineral, la întuneric, în atmosferă de hidrogen, CO_2 și oxigen, cu condiția ca tensiunea de O_2 să fie scăzută și probabil, de unele bacterii din genurile *Chromatium* și chiar *Chlorobium* (Aragno și Schlegel, 1981).

Semnificație biologică. Datorită particularităților lor biochimice și de metabolism, hidrogen-bacteriile au o largă răspîndire, și în același timp, capacitatea de a ocupa nișe ecologice speciale. Capacitatea lor de a utiliza alternativ fie substanțe organice, fie hidrogen și CO_2 le permite să se dezvolte în condiții naturale, în mediile în care se realizează eliberarea unor mari cantități de hidrogen și CO_2, în care au mari avantaje selective față de alte microorganisme. Habitatul major al bacteriilor care oxidează aerob hidrogenul îl constituie însă straturile superioare ale solului, nămolurile din lacurile holomictice și bazinele acvatice, deoarece în aceste zone hidrogenul, CO_2 și unele substanțe organice se acumulează în cantități suficiente pentru a le asigura creșterea în condiții optime (Aragno și Schlegel, 1981). Hidrogenul este însă folosit în diferitele medii în care se eliberează și de alte categorii de microorganisme, care determină apariția a diferiți produși finali (fig. 163). Hidrogenul se

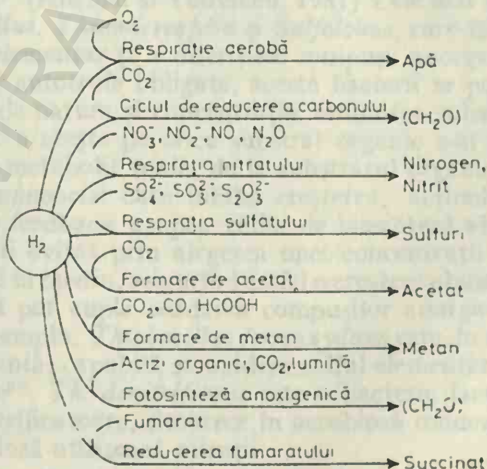


Fig. 163. — Principalele căi de utilizare a hidrogenului de către diferite grupuri de bacterii, în prezența unor acceptori de hidrogen (după Aragno și Schlegel, 1981).

eliberează abundent în medii ca: bălți, orezării, terenuri înmlăștinate, rumen, în zone cu fermentații bacteriene, dar și în solurile bine aerate. În condiții anaerobe, cea mai mare parte din hidrogen este folosită pentru producerea de metan, H_2S și azot gazos.

În sol, o sursă suplimentară de hidrogen este cea produsă în cursul procesului de fixare simbiotică a azotului. Sistemul enzimatic al nitrogenazei reduce nu numai azotul, ci și protonii (H^+), cu producere concomitentă de H_2.

Hidrogenul astfel produs este parțial utilizat pentru a produce energie. Cea mai mare parte însă este folosită pentru a reduce oxigenul, care a difuzat în interiorul celulei și pentru a proteja, pe această cale, nitrogenaza foarte sensibilă și ușor inactivată de O_2. Deși cele mai multe bacterii fixatoare de N_2 au sisteme hidrogenazice foarte active, frecvent rata de producere a hidrogenului depășește rata consumului, astfel încît hidrogenul produs în exces este eliberat în mediu în cantități mari de nodozitățile plantelor rădăcinoase, fie *in situ*, fie *in vitro* după excizia lor din rădăcini (Evans, 1977).

METABOLISMUL SULFULUI

Sulful este un nutrient cu deosebită importanță în natură, în special sub forma sa cea mai oxidată, de sulfat (SO_4^{2-}), cea mai redusă, S^{2-} (cel mai frecvent ca H_2S sau ca sulfură), și în forma intermediară de sulf elementar (S^0). Conversia sulfului de la o formă la alta este efectuată predominant de bacterii. Unul dintre procesele cele mai importante cantitativ este cel de utilizare a sulfatului, care poate satisface atît nevoile de sulf oxidat, cît și pe cele de sulf redus ale celor mai multe organisme (Roy și Trudinger, 1970).

BACTERIILE CARE OXIDEAZĂ COMPUȘII ANORGANICI AI SULFULUI

Bacteriile sulfoxidante formează un grup relativ mare de microorganisme, aparținînd la 11 genuri*) (Kuenen și Tuovinen, 1981). Cele mai studiate aparțin genurilor *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* și *Sulfolobus*, care își obțin energia din oxidarea sulfului elementar și a diferiților compuși anorganici ai acestuia. Considerate inițial ca autotrofe obligate, aceste bacterii se pot dezvolta și organotrof, în funcție de natura și concentrația anumitor substraturi organice. Incapacitatea lor de a crește pe orice substrat organic s-ar datora fie formării și acumulării unui metabolit toxic, de la substratul organic netolerat, fie acțiunii anumitor aminoacizi care inhibă creșterea, acționînd ca represori sau ca inhibitori prin feedback asupra căilor de biosinteză ale altor aminoacizi. Fenomenul poate fi evitat prin alegerea unei concentrații corespunzătoare a acestor aminoacizi în mediu, asigurînd astfel o creștere abundentă.

Unii membri ai grupului pot cupla oxidarea compușilor anorganici ai sulfului cu alte procese: spre exemplu, *Thiobacillus ferrooxydans* este, în același timp, o bacterie sulf-și feroxidantă, capabilă să oxideze sulful elementar, H_2S, $Na_2S_2O_3$, precum și Fe^{2+} la Fe^{3+}. *Th. denitrificans* este o bacterie facultativ anaerobă, sulfoxidantă și denitrificatoare, deoarece în aerobioză oxidează S^0, H_2S și $Na_2S_2O_3$, iar în anaerobioză utilizează nitrații.

Al doilea grup de bacterii sulfoxidante este alcătuit din membri ai genurilor: *Achromatium*, *Macromonas*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Thiovulum*, *Beggiatoa*, *Thiothrix* și *Thioploca*. El include microorganisme a căror apar-

*) Bacteriile fototrofe capabile să oxideze compușii reduși ai sulfului sînt descrise în capitolul „Fotosinteza".

tenență la acest grup, ca și separarea lor în genuri distincte, se bazează aproape exclusiv pe criterii morfologice (fig. 164) și pe argumente indirecte. Cu excepția celor din genul *Beggiatoa*, care au fost cultivate pe medii organice, toate celelalte nu au fost încă cultivate și obținute în stare pură și, ca urmare, metabolismul lor nu este studiat. Între faptele de observație care pledează pentru introducerea lor în acest grup sînt: 1) prezența lor constantă în medii care conțin H_2S și O_2 și absența în medii în care H_2S lipsește ; 2) apariția și dispariția incluziunilor de sulf intracelulare, legată de capacitatea lor de a oxida sulful, H_2S și sulfurile. Relația lor cu compușii sulfului ar varia de la chimiolitotrofie obligată la oxidarea H_2S (și a S^{2-} în general), cu rol de detoxificare și protecție sau chiar de utilizare fără un rol special (La Rivière și Schmidt, 1981).

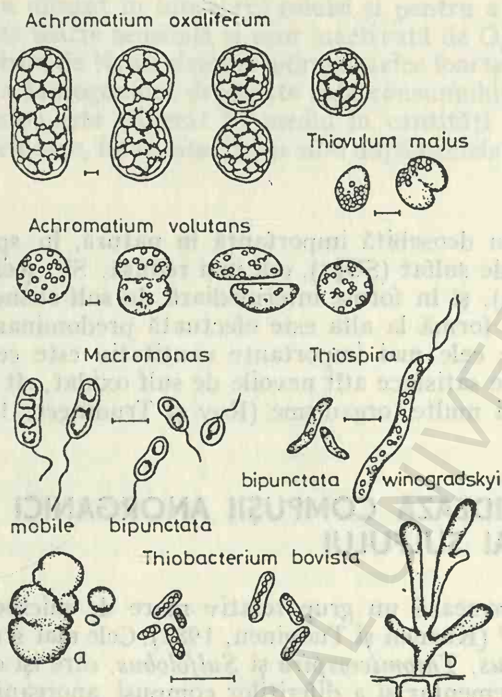


Fig. 164. — Reprezentarea schematică a bacteriilor sulfuroase incolore, care oxidează compușii reduși ai sulfului. Barele au 10 µm, cu excepția coloniilor tipice pentru specia *Thiobacterium*, cu formă veziculară (a) și dendroidă (b) (după La Rivière și Schmidt, 1981).

BIOCHIMIA OXIDĂRII BACTERIENE A COMPUȘILOR SULFULUI

Bacteriile sulfuroase incolore oxidează sulful elementar și compușii săi, obținînd, pe această cale, deopotrivă, substanțele (puterea) reducătoare și energia necesară organismului, spre deosebire de bacteriile sulfoxidante fototrofe, care folosesc energia solară, iar oxidările sulfului servesc doar pentru furnizare de electroni. Bacteriile sulfoxidante, în general, și cele

din genul *Thiobacillus*, în special, s-au diferenţiat, dobîndind capacitatea de a oxida o gamă largă de substraturi, după cum rezultă din reacţiile următoare:

1) *Th. tioparus*: $H_2S + 2\,O_2 \rightarrow H_2SO_4$
2) *Beggiatoa**): $2\,H_2S + O_2 \rightleftharpoons 2\,S^0 + 2\,H_2O$
3) *Th. thiooxydans*: $2\,S^0 + 3\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,H_2SO_4$
4) *Th. tioparus*: $Na_2S_2O_3 + 2\,O_2 + H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$
5) *Th. tioparus*: $2\,Na_2S_4O_6 + 7\,O_2 + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Na_2SO_4 + 6\,H_2SO_4$
6) *Th. thiocyanooxydans*: $2\,KSCN + 4\,O_2 + 4\,H_2O \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + K_2SO_4 + 2\,CO_2$
7) *Th. denitrificans*: $8\,KNO_3 + 5\,H_2S \rightarrow 4\,K_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\,N_2 + 4\,H_2O$
8) *Th. denitrificans*: $6\,KNO_3 + 5\,S^0 + 2\,H_2O \rightarrow 3\,K_2SO_4 + 2\,H_2SO_4 + 3\,N_2$
9) *Th. denitrificans*: $8\,NaNO_3 + 5\,Na_2S_2O_3 + H_2O \rightarrow 9\,Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\,N_2$
10) *Th. ferrooxidans*: $2\,FeS_2 + 2\,H_2O + 7\,O_2 \rightarrow 2\,FeSO_4 + 2\,H_2SO_4$
11) *Th. ferrooxidans*: $4\,FeSO_4 + O_2 + 2\,H_2SO_4 \rightarrow 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,H_2O$

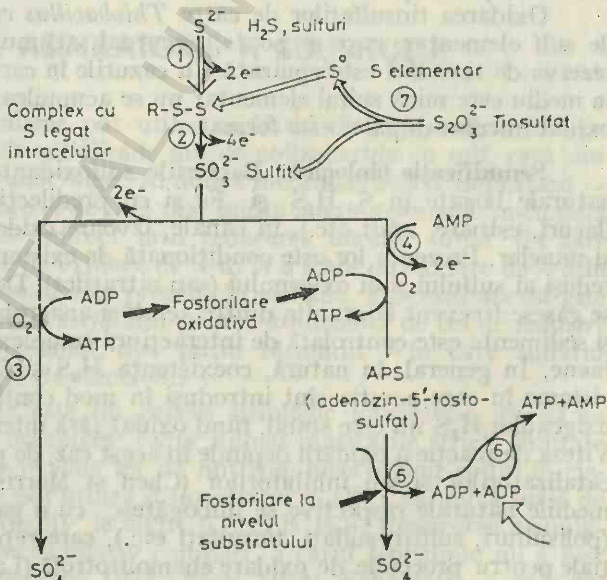


Fig. 165. — Etapele oxidării diferiţilor compuşi anorganici ai sulfului de către bacteriile sulfoxidante (*Thiobacillus* sp.). Tiosulfatul este introdus în reacţii, după clivare la sulf elementar şi sulfat. Cheia enzimelor: 1. Enzimă necunoscută. 2. Sulf oxidaza (enzima oxidantă a S). 3. Sulfit oxidaza (sulfit citocrom *c* oxidoreductază). 4. APS-reductaza. 5. ADP-sulfurilaza. 6. Adenilat kinaza. 7. Enzima de clivare a tiosulfatului (rodanază).

În realitate, biochimia proceselor sulfoxidante este mult mai complicată (fig. 165) şi are numeroase aspecte încă nelămurite, probabil datorită faptului că diferitele specii de *Thiobacillus* urmează căi parţial individuale. Într-o

*) Reacţia este reversibilă. Sulful elementar depus în celule ca incluziuni este utilizat prin oxidare la H_2SO_4, folosind rezervele de energie din celule cînd H_2S este epuizat din mediu.

primă fază, H_2S și sulfurile, în general, sînt oxidate la sulf elementar (S^0), sub acțiunea unei enzime încă neidentificate, cu cedarea a doi electroni. Datorită acestei reacții, în structura bacteriilor chemolitotrofe care folosesc H_2S se observă formarea rapidă de incluziuni intracelulare de sulf elementar. Sulfurile reacționează cu grupările sulfhidril din celule, alcătuind un complex cu S legat intracelular, după care are loc oxidarea la sulfit (SO_3^{2-}), formă care ocupă o poziție centrală în calea de oxidare a compușilor sulfului, sub acțiunea sulfoxidazei. Tiosulfatul ($S_2O_3^{2-}$), care poate fi considerat ca o sulfură a sulfitului (SSO_3^{2-}), intră în metabolism după scindare în sulfit și S^0 sub acțiunea enzimei de clivare a tiosulfatului. Două sisteme enzimatice catalizează oxidarea sulfitului la sulfat și anume *sulfit oxidaza* (citocrom *c* oxidoreductaza), legată de membrane, și *adenozin-5-fosfo-sulfat reductaza*, cărora le corespund două căi diferite de oxidare a sulfitului, cu producere de ATP. În prima cale, sulfitul este oxidat la sulfat de sulfitoxidaza legată de citocrom, cu formare de ATP prin fosforilare oxidativă. În cea de-a doua, sulfitul reacționează cu AMP pentru a forma, prin îndepărtarea a doi electroni, adenozinfosfosulfat (APS). Cei doi electroni sînt transferați la O_2 pe calea sistemului citocromilor, ducînd la formarea de ATP prin fosforilare oxidativă, în timp ce APS reacționează cu fosfatul anorganic (Pi) și prin fosforilare la nivelul substratului (AMP → →ADP) este convertit la ADP și sulfat. În cele din urmă, adenilat kinaza convertește 2 ADP la ATP și AMP, în așa fel încît oxidarea a doi ioni de sulfit are ca rezultat producerea a 3 molecule de ATP, două pe calea fosforilării oxidative și una pe calea fosforilării la nivelul substratului.

Oxidarea tiosulfaților de către *Thiobacillus* este însoțită de producerea de sulf elementar, care se poate, eventual, acumula pentru a fi folosit cînd rezerva de tiosulfat este epuizată. În cazurile în care concentrația tiosulfaților în mediu este mică sulful elementar nu se acumulează, probabil pentru că este oxidat imediat după ce este format.

Semnificație biologică. Bacteriile sulfoxidante sînt prezente în mediile naturale bogate în S, H_2S și Fe și cu predilecție în sedimentele acvatice (lacuri, estuare, mări etc.), în canale, izvoare calde acide, efluenți de drenaj ai minelor. Prezența lor este condiționată de existența simultană a compușilor reduși ai sulfului și ai oxigenului (sau nitraților). De aceea, în mediile acvatice se găsesc frecvent la granița dintre aerob și anaerob. Distribuția lor în sol, ape și sedimente este controlată de interacțiuni complexe, fizice, chimice și microbiene. În general, în natură, coexistența H_2S și O_2 este asigurată numai în sisteme în care aceștia sînt introduși în mod continuu, deoarece în prezența oxigenului H_2S nu este stabil, fiind oxidat fără intervenția microorganismelor. Viteza de reacție a oxidării depinde în acest caz, de pH, temperatură, prezența, catalizatorilor și/sau inhibitorilor (Chen și Morris, 1972). Pe această cale, mediile naturale respective se îmbogățesc cu o gamă largă de compuși ai S (polisulfuri, sulfiți, sulfați, tiosulfați etc.), care reprezintă substraturi potențiale pentru procesele de oxidare chemolitotrofă (La Rivière și Schmidt, 1981). Microorganismele sulfoxidante tolerează variații mari de pH (pH 1,0 — pH 9,0) și de tematperură (pînă la 60 — 80°C).

Ele au avut și continuă să aibă un rol important — alături de alte activități microbiene — în ciclul biogeochimic al sulfului și în evoluția biosferei (Kuenen, 1976; Kuenen și Tuovinen, 1981). Depozitele de sulf exploatate în prezent au o origine biogenă și s-au format prin reducerea sulfatului, urmată

de o etapă de oxidare, în care au participat bacteriile sulfoxidante (La Rivière și Schmidt, 1981). Dovada o constituie existența sulfuretelor, în care sulful se acumulează și în prezent.

Oxidarea H_2S și a sulfurilor, în general, la sulfat reprezintă o etapă importantă în regenerarea puterii oxidative în bazinele acvatice, în care sulfatul joacă rol în mineralizarea anaerobă. În apele deschise, marine și oceanice, bacteriile sulfoxidante oxidează compușii volatili ai sulfului, eliberați din sedimente în cursul descompunerii unora din constituenții acestora. Bacteriile sulfoxidante joacă astfel un rol important în reglarea cantitativă a emanațiilor de H_2S produs pe cale biologică, dar contribuie, în același timp, la poluarea mediului cu acizi și metale eliberate prin acțiunea lor asupra diferitelor materiale reziduale (Tuovinen și Kelly, 1972). Ele solubilizează compușii sulfului în sol, făcîndu-i disponibili sub formă de sulfați, pentru a fi asimilați de microorganisme și de plante, dar în același timp favorizează producerea de soluri acide.

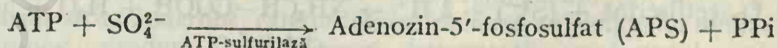
Bacteriile sulfoxidante produc acid sulfuric (pînă la H_2SO_4 1,5N) și fier feric (Fe^{3+}) în condiții asociate frecvent cu coroziunea conductelor și altor structuri metalice și a betoanelor, în special submerse. Această proprietate este exploatată în biometalurgie pentru leșierea metalelor neferoase din zăcămintele sărace și depozitele de steril.

REDUCEREA ASIMILATORIE A SULFATULUI

Cele mai multe organisme pot utiliza sulfatul direct, printr-o reacție de esterificare, cu formare de sulfolipide sau de polizaharide cu sulf, cum sînt cele din stratul gelatinos al unor alge. Al doilea mecanism foarte important — efectuat însă numai de plante și de cele mai multe microorganisme (niciodată de animale) — se realizează indirect prin reducerea ionului sulfat (în care atomul de S este într-o stare de oxidare de +6) la o stare de oxidare de —2 în gruparea tiol (—SH) în care el este prezent în cisteină. Procesul acesta este numit de *reducere asimilatorie a sulfatului* pentru a-l deosebi de cel de *reducere dezasimilatorie a sulfatului* — mult mai puțin răspîndit — în care sulfatul este utilizat ca acceptor final de electroni.

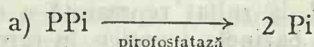
Reducerea asimilatorie este un proces fiziologic biosintetic, reglat în așa fel încît cele mai multe organisme reduc numai cantitățile strict limitate de sulfat, pentru a satisface nevoile lor de nutriție, încorporînd sulful în cisteină. Multe microorganisme pot utiliza și tiosulfatul ($S_2O_3^{2-}$), ca unică sursă de sulf, deoarece îl pot cliva reductiv la sulfit și deci la H_2S. Reducerea asimilatorie a sulfatului este un proces relativ complex, a cărui biochimie nu a fost încă complet elucidată (Postgate, 1973; Peck, 1974). Schematic, a fost descrisă ca formată din patru etape succesive:

1) Activarea sulfatului necesară, datorită caracterului relativ nereactiv al acestui compus, după reacția:

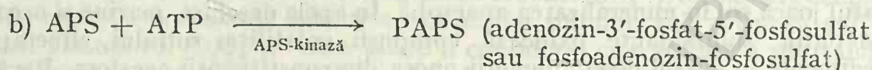


$$ATP + SO_4^{2-} \xrightarrow[\text{ATP-sulfurilază}]{} \text{Adenozin-5'-fosfosulfat (APS)} + PPi$$

Evoluția normală a procesului este condiționată de prezența unei cantități mari de ATP celular și de menținerea unor nivele scăzute ale concentrației APS și pirofosfatului (PPi), care sînt îndepărtate prin două reacții:

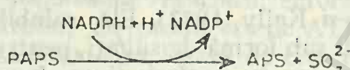


$$\text{a) PPi} \xrightarrow[\text{pirofosfatază}]{} 2\ \text{Pi}$$



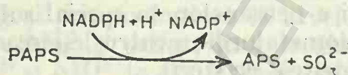
$$\text{b) APS} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{APS-kinază}]{} \text{PAPS}$$ (adenozin-3′-fosfat-5′-fosfosulfat sau fosfoadenozin-fosfosulfat)

2) Reducerea radicalului sulfat activat atașat la PAPS, la sulfit (SO_3^{2-}), cu ajutorul unei enzime care utilizează NADPH ca donator de electroni:



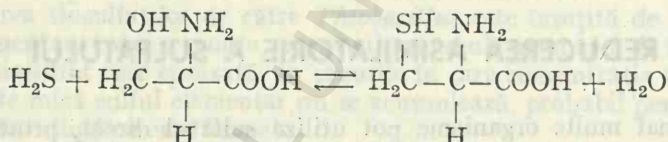
$$\text{PAPS} \xrightarrow{\text{NADPH}+\text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+} \text{APS} + SO_3^{2-}$$

3) Reducerea sulfitului la H_2S de către o altă enzimă, care utilizează NADPH ca donator de electroni:



$$\text{PAPS} \xrightarrow{\text{NADPH}+\text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+} \text{APS} + SO_3^{2-}$$

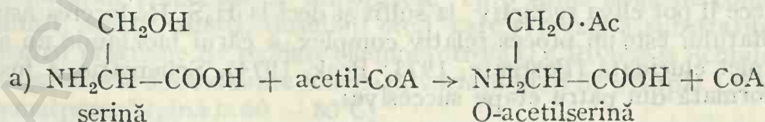
4) Încorporarea în aminoacidul-cheie, cisteina:



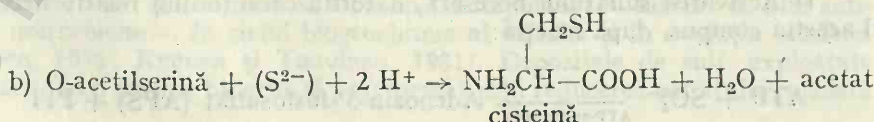
$$H_2S + H_2C(OH)-CH(NH_2)-COOH \rightleftharpoons H_2C(SH)-CH(NH_2)-COOH + H_2O$$

În realitate, reducerea APS la nivelul S^{2-} este un proces complex, practic nedescifrat, probabil în mare parte datorită existenței unor sisteme enzimatice sensibile față de oxigen (ca și nitrogenaza) și, în consecință, relativ greu de izolat și studiat. Fig. 166 prezintă una din schemele posibile de reducere a sulfatului activat și de încorporare a grupării —SH în cisteină. Din schemă rezultă că în cursul acestui proces, realizat posibil de un complex unic, gigant, multienzimatic (Evans, 1977), nu apar compuși intermediari liberi de tipul SO_3^{2-} sau S^{2-}, care rămîn totdeauna legați de o moleculă-purtător ($X-S^-$).

Faza finală a reacției de asimilare reductivă la microorganisme este reprezentată de reacția dintre gruparea S^{2-} legată și o moleculă-acceptor *O-acetilserină* (formată prin acetilarea serinei cu acetil-CoA), după reacțiile:



$$\text{a) } NH_2CH(CH_2OH)-COOH\ (\text{serină}) + \text{acetil-CoA} \rightarrow NH_2CH(CH_2O\cdot Ac)-COOH\ (\text{O-acetilserină}) + \text{CoA}$$



$$\text{b) O-acetilserină} + (S^{2-}) + 2\,H^+ \rightarrow NH_2CH(CH_2SH)-COOH\ (\text{cisteină}) + H_2O + \text{acetat}$$

Toţi ceilalţi compuşi celulari ai sulfului (ca, de exemplu, metionina, tiamina, biotina, glutationul etc.) derivă de la gruparea —SH a cisteinei, produsul-cheie al produsului de asimilare reductivă a sulfatului. Procesul de activare şi reducere a sulfatului este foarte costisitor din punctul de vedere al

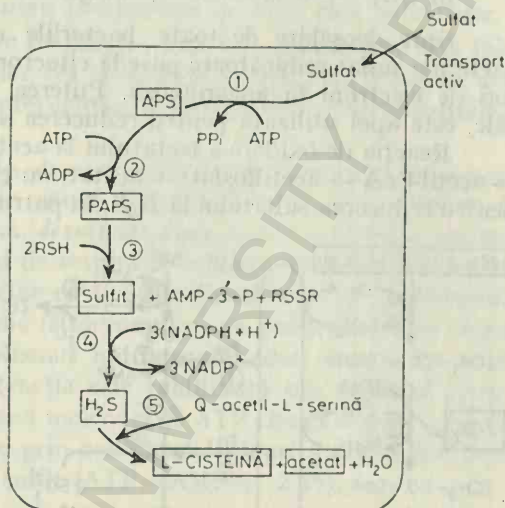


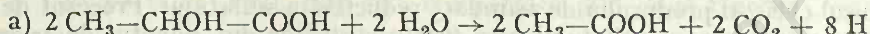
Fig. 166. — Reducerea asimilatorie a sulfatului şi formarea cisteinei. RSH—tioredoxină (forma sa redusă este regenerată cu NADPH). APS—adenozin-5'-fosfosulfat; PAPS — adenozin-3'-fosfat-5'-fosfosulfat. Cheia enzimelor: 1. ATP-sulfurilaza. 2. APS-fosfokinaza. 3. PAPS-reductaza. 4. Sulfit reductaza. 5. O-acetil-serin sulfhidrilaza.

consumului de energie (ca dealtfel şi alte procese metabolice cum sînt fixarea carbonului, a azotului, reducerea nitratului etc.). Aceasta ar putea explica şi incapacitatea animalelor de a efectua acest tip de metabolism, pe care l-au pierdut într-o perioadă foarte timpurie a evoluţiei lor, devenind dependente de plante şi mai ales de bacterii pentru aceşti produşi esenţiali pentru existenţa lor.

REDUCEREA DEZASIMILATORIE A SULFATULUI

Spre deosebire de microorganismele care utilizează sulfatul pentru formarea constituenţilor celulari ce conţin sulf („reducerea asimilatorie a sulfaţilor"), bacteriile care fac reducerea dezasimilatorie utilizează sulfatul ca acceptor final de electroni, în oxidarea anaerobă a unor substraturi organice. Ele produc şi determină acumularea unor mari cantităţi de H_2S în mediile naturale în care se dezvoltă, participînd la formarea şi transformarea depozitelor minerale în natură. Bacteriile care realizează acest proces formează un grup relativ limitat numeric, cu morfologii diferite, avînd ca principali reprezentanţi genurile: *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*, *D. salexigens*, *D. vulgaris*, *D. africanus*, *D. gigas* etc.), *Desulfomonas* (*D. pigra*), *Desulfotomaculum* (*D. nigrificans*, *D. ruminis*, *D. orientis*), care fac parte dintre cele mai vechi forme de viaţă apărute pe pămînt (Peck, 1966) şi unele specii ale genului *Clostridium*. Bacteriile sulfat-reducătoare din acest grup sînt organisme strict anaerobe, care utilizează ca sursă de energie un număr restrîns de compuşi, produşi finali ai unor fermentaţii, ca: lactatul, malatul sau

etanolul, pe care îi oxidează numai pînă la acetat (deoarece nu au un ciclu tricarboxilic funcțional) și la CO_2, după reacțiile:



a) $2\,CH_3{-}CHOH{-}COOH + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_3{-}COOH + 2\,CO_2 + 8\,H$



b) $SO_4^{2-} + 8\,H \rightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$

Spre deosebire de toate bacteriile chemoheterotrofe strict anaerobe, bacteriile sulfat-reducătoare posedă citocromi *a* și *c* care participă ca transportori de electroni în anaerobioză. Puterea reducătoare, generată pe această cale, este apoi utilizată pentru reducerea sulfatului la H_2S.

Reacția de oxidare a lactatului la acetat se realizează pe calea: piruvat→ → acetil-CoA → acetilfosfat → acetat, cu eliberarea a 8 H, care sînt utilizați pentru reducerea sulfatului la H_2S, în patru trepte succesive (fig. 167).

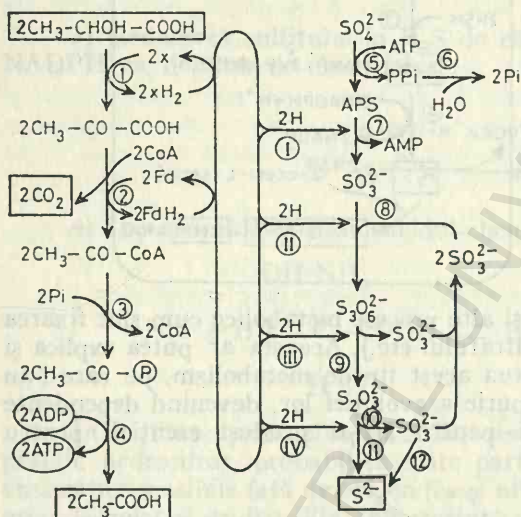


Fig. 167. — Reacțiile căii de reducere dezasimilatorii a sulfatului și enzimele care le realizează (dup- Gottschalk, 1979). Cheia enzimealor: 1. Lactic dehidrogenaza. 2. Piruvat-ferredoxin oxireductaza. 3. Fosfotransacetilaza. 4. Acetat kinaza. 5. ATP-sulfurilaza. 6. Pirofosfataza. 7. APS-reductaza. 8. Sulfit reductaza (desulfoviridina). 9. Tritiona reductaza. 10. Tiosulfat reductaza.

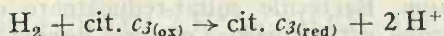
Inițial, sulfatul (înainte de utilizarea sa ca acceptor de electroni) este activat pe cale enzimatică, cu consum de energie, pentru a forma un compus organic macroergic al sulfului, adenozin-5'-fosfosulfat (APS). În această reacție, catalizată de *sulfatadenilil transferază*, pirofosfatul este lăsat liber și apoi convertit rapid la fosfat anorganic, în timp ce sulfatul se combină cu componentul AMP al ATP.

Reducerea sulfatului și oxidarea hidrogenului molecular implică participarea unei hidrogenaze foarte active și a unui citocrom special (c_3), cu potențial redox foarte scăzut (—250 mV). Citocromul funcționează ca purtător de electroni, esențial în reacția de formare a sulfitului, catalizată de adenililsulfat reductază:



$$APS + \text{cit. } c_{3(red)} \rightarrow AMP + \text{cit. } c_{3(ox)} + SO_3^{2-}.$$

Reducerea finală la H_2S se face prin reducerea cit. c_3 oxidat sub acțiunea hidrogenazei și a sulfitului sub acțiunea sulfit reductazei, după reacțiile:



$$H_2 + \text{cit. } c_{3(ox)} \rightarrow \text{cit. } c_{3(red)} + 2\,H^+$$



$$SO_3^{2-} + 6\,H^+ \rightarrow S^{2-} + 3\,H_2O$$

Fig. 167 evidenţiază particularităţile căilor de dezasimilare a sulfatului: producerea de sulfit şi, final, de H_2S se realizează nu numai prin reducerea sulfatului pe calea APS, ci şi de la o serie de alţi produşi ai sulfului ca: tritionatul ($S_3O_6^{2-}$), tiosulfatul ($S_2O_3^{2-}$) şi bisulfatul (SO_3^{2-}). Aceasta demonstrează posibilitatea utilizării unei game largi (şi a unor cantităţi mari) de compuşi anorganici ai sulfului pentru producerea de H_2S care este toxic.

Reducerea sulfatului se poate realiza pe două căi, dintre care una foloseşte un singur sistem enzimatic, iar cea de-a doua implică participarea unei căi de reciclare a sulfitului şi intervenţia a trei enzime: *desulfoviridina, tritionat-* şi *tiosulfat reductaza.*

Caracteristic pentru acest tip de metabolism este prezenţa, în special la bacteriile sulfat-reducătoare din genul *Desulfovibrio,* a unei proteine de culoare verde, care conţine porfirină, *desulfoviridina,* avînd activitate enzimatică de tip sulfit reductază. Lanţul de respiraţie celulară al bacteriilor sulfat-reducătoare conţine, pe lîngă proteine cu FeS, ca ferredoxina, şi rubredoxină, menachinonă şi un sistem citocromic (citocromul c_3, cu potenţial redox scăzut — 250 mV) implicate în metabolismul hidrogenului, dar situsul lor exact de reacţie este încă necunoscut. Reacţia este echilibrată sub raportul producerii şi consumului de ATP: cele două molecule de ATP cîştigate prin oxidarea lactatului la acetat sînt consumate prin cele două legături macroergice necesare pentru reducerea sulfatului la sulfit (ATP→AMP + 2 Pi).

Semnificaţie biologică. Bacteriile sulfat-reducătoare sînt larg răspîndite în medii acvatice şi terestre anaerobe în care au loc descompuneri microbiene ale substanţelor organice de natură vegetală şi animală. Ele tolerează condiţii extreme de frig, căldură, salinitate şi presiune, şi au drept habitat permanent şi semnificativ sedimentele marine, estuarine, din mlaştini, lacuri saline şi hipersaline. Unele specii, *Desulfovibrio salexigens,* după cum spune şi denumirea, ca şi *D.* var. *aestuarii* sînt dependente de o concentraţie crescută de NaCl în mediu. Bacteriile sulfat-reducătoare au fost izolate din minele de sulf, din sondele de petrol la adîncimea de —2000 m pînă la —4000 m şi din sedimente marine situate la —7000 m pînă la —10 000 m. Aceste tulpini pot fi cultivate la 65—85°C şi chiar la 104°C, la presiunea de 1 000 atm (Zobell şi Morita, 1957).

Capacitatea lor de a produce mari cantităţi de H_2S duce la o mare varietate de efecte economice, industriale şi ecologice. Au un rol important în coroziunea conductelor şi blocarea apelor de injecţie în sondele de petrol, în coroziunea conductelor petroliere de tip pipe-line, a sistemelor de încălzire şi a structurilor subacvatice (Baumgartner, 1962) cu importanţă economică considerabilă (Le Gall, 1963; Postgate, 1965). Dostalek (1956, 1961) le-a folosit pentru a creşte recuperarea secundară a ţiţeiului, după injecţia în zăcăminte, iar Starkey (1960, 1961) a evidenţiat rolul lor în industria hîrtiei. Au fost, de asemenea, incriminate în formarea unor zăcăminte minerale care conţin sulf sub diferite forme. Efectele ecologice sînt asociate cu poluarea apelor (foarte intensă cînd numărul bacteriilor sulfat-reducătoare depăşeşte 10^4—10^6 per ml), cu mirosul dezagreabil, determinat de acumularea de H_2S şi înnegrirea apelor şi a sedimentelor datorită precipitării sulfurii de fier.

REDUCEREA DEZASIMILATORIE A SULFULUI ELEMENTAR

Relativ numeroase microorganisme procariote și eucariote pot reduce sulful elementar (S^0) în cursul metabolismului lor normal fermentativ, prin reacții nespecifice și incidentale, a căror semnificație biologică pentru speciile respective nu este cunoscută (Roy și Trudinger, 1970). Pe lîngă acestea, există trei grupuri diferite de bacterii, pentru care reducerea S^0 reprezintă — uneori, în anumite condiții — un proces obligatoriu al metabolismului lor dezasimilator.

1) Bacteriile care fac constant reducerea dezasimilatorie a S^0 (bacteriile „adevărate" sau obligat dezasimilatoare) sînt strict anaerobe și au ca reprezentant tipic *Desulfuromonas acetooxydans*, care utilizează reducerea S^0 ca proces dezasimilator primar și esențial pentru creștere. Incapabile să folosească compușii oxidați anorganici ai sulfului, utilizează, în anumite condiții, cistina sau glutationul oxidat, pe care le reduc la cisteină și respectiv glutation redus.

Sînt prezente în nămol, sedimente marine și estuarine, metantancuri și digestoare cu reziduuri provenite de la porcine. Toate tulpinile de *Desulfuromonas* formează culturi mixte sintrofice cu bacteriile sulfuroase verzi, în care S^0 excretat de bacteriile verzi (ca produs de oxidare a H_2S) este imediat redus la H_2S, în prezența acetatului, care este oxidat la CO_2.

2) Bacteriile sulf-reducătoare facultative sînt reprezentate numai de *unele* bacterii sulfat-reducătoare (unele tulpini de *Desulfovibrio)*, care pot utiliza S^0 ca acceptor de electroni în absența altor acceptori de electroni posibili și, în primul rînd, în absența sulfatului din mediu.

În această categorie intră și bacteria saprofită *Campylobacter*, care, în condiții anaerobe și în absența altor compuși alternativi, ca acceptori de electroni, folosește S^0 în metabolismul său dezasimilator.

3) Fotobacteriile sulfuroase verzi și purpurii care folosesc S^0 intra- și extracelular ca acceptor de electroni pentru menținerea unui metabolism fermentativ foarte lent, în condiții de întuneric (Trüper și Pfennig, 1966; Pfennig și Biebl, 1981).

BACTERIILE CARE UTILIZEAZĂ COMPUȘII FIERULUI

(Pl. 26—28)

Observate, în special, în anumite bazine acvatice și izvoare minerale cu un conținut ridicat în compuși reduși ai fierului, ferobacteriile formează un grup fiziologic relativ puțin studiat, heterogen din punct de vedere sistematic, referitor la care, de la descoperirea sa de către Winogradski (1888) și pînă în prezent, s-au acumulat date foarte contradictorii și greu de conciliat. Bacteriile feruginoase sînt împărțite în două mari grupuri:

1) **Bacteriile filamentoase** sînt reprezentate în special de genurile *Sphaerotilus* și *Leptothrix,* la care celulele individuale formează trihoame, învelite de o teacă organică, mucilaginoasă, impregnată sau acoperită, în special la *Leptothrix,* cu hidroxid feric ($Fe(OH)_3$) sau hidroxid de mangan tetravalent ($MnO(OH_2)$).

2) **Bacteriile nefilamentoase**

Familia *Siderocapsaceae* (Zavarzin, 1974) este formată din patru genuri diferențiate, din cauza dificultăților de cultivare, numai pe criterii morfologice: *Siderocapsa, Naumanniella, Ochrobium* și *Siderococcus.* Prezente în apele feruginoase, aceste bacterii depun oxizi de fier și/sau de mangan în/sau pe suprafața capsulelor, cînd acestea sînt prezente, formînd uneori manșoane pericelulare sau îi elimină în materialul extracelular. Reacțiile lor metabolice sînt încă necunoscute.

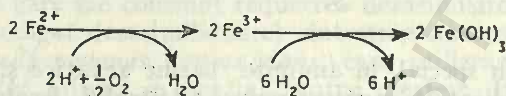
Gallionella ferruginea. Bacterie, probabil chemolitotrofă, capabilă să oxideze Fe feros la Fe feric, în timp ce asimilează cantități importante de CO_2, are celule sferoidale sau reniforme, situate la extremitățile unor filamente lungi, formate din 3—40 de fibrile răsucite unele față de altele. Formează depozite roșii-brune, sub forma unor benzi spiralate, alcătuite din substanța excretată de celulele terminale, care conțin pînă la 90 % din greutatea lor uscată hidroxid feric.

Pe lîngă importanța practică, legată de faptul că blochează conductele de apă, canalele de drenaj, sistemele de irigație (Ford, 1978), *Gallionella* are o importanță biogeochimică decurgînd din posibilitatea participării la formarea zăcămintelor de fier, datorită multiplicării sale intense. Specia cel mai mult studiată este *G. ferruginea.* Este probabil că cea de-a doua specie descrisă, *G. filamenta,* nu este decît o variantă ecologică, cu aspect diferit, datorită subnutriției.

Cele mai multe cercetări de biochimie au fost efectuate pe speciile *Thiobacillus ferrooxidans* și *Ferrobacillus ferrooxidans* a căror taxonomie este con-

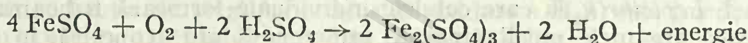
fuză. Dealtfel, Unz și Lundgren (1961), ca și Margalith (1966) au propus eliminarea genului *Ferrobacillus*, ca fiind creat arbitrar, deoarece cele mai multe tulpini izolate din natură se comportă ca membri ai genului *Thiobacillus*, întrucît au și proprietatea de a oxida S elementar și compușii anorganici ai acestuia ($Na_2S_2O_3$ și chiar H_2S) la H_2SO_4. *Ferrobacillus sulfooxidans*, descris de Kinsel (1960), este o bacterie autotrofă care utilizează CO_2 atmosferic, ca unică sursă de C, și sulfatul de NH_4, ca sursă optimă de N. Obține energia necesară pentru creștere prin oxidarea Fe feros și a sulfului elementar. După unii cercetători, *F. sulfooxidans* ar fi identic cu *F. ferrooxidans*.

Thiobacillus ferooxidans oxidează fierul feros (Fe^{2+}) la fier feric (Fe^{3+}):



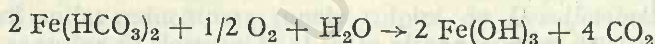
Deoarece potențialul de oxidoreducere al cuplului Fe(II)/Fe(III) la pH 7 este + 0,77 v, în această reacție se obține numai o cantitate mică de energie, care este utilizată pentru creșterea autotrofă a bacteriei.

După Suzuki (1974), reacția globală este următoarea:



$$4\ FeSO_4 + O_2 + 2\ H_2SO_4 \rightarrow 2\ Fe_2(SO_4)_3 + 2\ H_2O + \text{energie}$$

sau

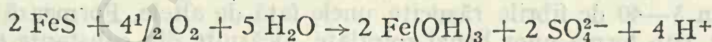


$$2\ Fe(HCO_3)_2 + 1/2\ O_2 + H_2O \rightarrow 2\ Fe(OH)_3 + 4\ CO_2$$

cu producerea unei cantități mici de energie, utilizată pentru creștere autotrofă.

Oxidarea este inițiată de Fe^{2+}-citocrom *c* reductază și este urmată de transferul electronilor la sistemul citocromilor: $Fe^{2+} \rightarrow$ cit. *c* $\rightarrow$ cit. *a* $\rightarrow O_2$ (Yates, 1961). Fierul feric formează hidroxid feric ($Fe(OH)_3$), insolubil în apă, care precipită și se depune în capsulă sau în teaca bacteriană, pericelular, sau în mediu.

Deosebit de importantă este oxidarea de către *Th. ferrooxidans* a piritei minerale, sulfura feroasă, după reacția:



$$2\ FeS + 4^1/_2\ O_2 + 5\ H_2O \rightarrow 2\ Fe(OH)_3 + 2\ SO_4^{2-} + 4\ H^+$$

pentru care $\Delta G^{0\prime}$ (pH 2) = — 1 340 cal. Întrucît în această reacție se produce H_2SO_4, bacteriile care trăiesc în minele abandonate creează grave probleme de poluare, deoarece apele au pH 2,3 sau chiar inferior.

Ecologie și semnificație biologică. Deși unele tulpini se comportă ca autotrofe obligate, cele mai multe date pledează pentru caracterul de autotrofe facultative sau, în unele cazuri, chiar de organotrofe. Astfel, s-a demonstrat că 25% din tulpinile izolate din apele de drenaj ale unor mine se dezvoltă pe medii cu zaharoză, după o scurtă perioadă de adaptare.

Bacteriile feroxidante sînt prezente în apele și izvoarele feruginoase cu conținut mare de săruri de Fe redus. Rolul lor în metabolismul fierului

în aceste ape neutre sau alcaline este incert, deoarece ionii de Fe^{2+} sînt oxidați rapid în contact cu aerul. De aceea, fierul feros nu se acumulează în cantități suficiente pentru a asigura creșterea acestor bacterii în apele neutre. În apele acide din mine însă, această oxidare spontană nu are loc, favorizînd dezvoltarea *Th. ferrooxidans*, care se multiplică și transformă Fe^{2+} la hidroxid feric, colorînd apele în portocaliu. Datorită impermeabilității lor față de H^+, aceste bacterii se pot multiplica, rămînînd active chiar în medii foarte acide. Ele au un rol important în solubilizarea („leșierea") unor metale neferoase, cum este Cu din zăcămintele sărace în sulfură de Cu, sub formă de sulfat de Cu solubil.

PRODUȘII METABOLISMULUI MICROORGANISMELOR

Ca rezultat al activității lor metabolice, microorganismele formează mai multe categorii de produși care includ, pe lîngă constituenții structurali ai celulei, enzime extra- și intracelulare, compuși de rezervă energetică (glicogen, poli-β-hidroxibutirat), produși finali de metabolism, cărora li se adaugă o serie de produși cu importanță practică, uneori deosebită, incluzînd metaboliții primari, metaboliții secundari și produșii de bioconversie (bioderivați) (tabelul nr. 33).

METABOLIȚII PRIMARI

Metabolismul primar este, în esență, identic la toate organismele vii și implică activitatea unei serii de căi metabolice, anabolice și amfibolice interconectate, mediate de enzime, care furnizează energie, intermediari și precursori de biosinteză, pe care îi convertesc în macromolecule esențiale ca ADN, ARN, proteine, lipide și poliglucide (Demain, 1980).

Metaboliții primari, numiți și *metaboliți generali* (J. F. Martin, 1978), sînt molecule mici, prezente în toate tipurile de celule microbiene, reprezentînd produși intermediari sau finali ai căilor metabolismului intermediar, care sînt folosiți ca blocuri de construcție pentru macromoleculele esențiale sau convertiți în coenzime. Ei includ substanțe de tipul aminoacizilor, nucleotidelor, alcoolilor simpli, acizilor organici, vitaminelor, enzimelor, aldehidelor, CO_2, H_2, CH_4 etc. (Demain, 1980).

După Bu'Lock și Powell (1967), în evoluția unei culturi de microorganisme se observă două faze: a) *trofofaza*, corespunzînd perioadei de multiplicare rapidă și de acumulare de biomasă celulară (în medii bogate în substanțe nutritive și în condiții fizice corespunzătoare), și b) *idiofaza*, în cursul căreia creșterea și diviziunea celulelor încetează (ca rezultat al deficienței în nutrienți sau O_2, a acumulării de substanțe toxice sau unui alt factor limitant), dar celulele rămîn metabolic active.

Această comportare este datorată faptului că după însămînțarea lor într-un mediu bogat în nutrienți și în condiții fizice corespunzătoare, microorganismele se multiplică rapid, ajungînd la un număr mare de celule. Încetarea bruscă a creșterii are loc într-o fază în care mediul conține încă din abundență cei mai mulți nutrienți, iar condițiile de mediu rămîn favorabile metabolismului. Atît timp cît microorganismele cresc, în cursul trofofazei, metaboliții sînt utilizați pentru producerea constituenților celulari esențiali: aminoacizii, intermediarii ciclului Krebs și purinele sînt fixate în structuri

Tabelul nr. 33

Clasificarea produşilor rezultaţi din metabolismul microorganismelor (după Pirt, 1969)

Clasa de produşi	Exemple de procese şi/sau produse	Microorganismul producător	Unele condiţii speciale
COMPONENŢI STRUCTURALI AI CELULEI	Surse de C, N, P → perete celular	Bacterii şi fungi	—
ENZIME			
extracelulare	NH_4^+ + amidon → α-amilază	*Aspergillus*	Prezenţa inductorului
intracelulare	NH_4^+ + lactoză → β-galactozidaze	*E. coli*	,,
ACIZI NUCLEICI	NH_4^+ + riboză + fosfat + Mg + K → ARN ribosomal	Bacterii şi fungi	Rată maximă de creştere
COMPUŞI DE REZERVĂ ENERGETICĂ	Glucoză → glicogen Acetat → poli-β-hidroxibutirat	*E. coli* *B. megaterium*	Exces de glucoză Exces de acetat
PRODUŞI FINALI AI METABOLISMULUI ENERGETIC			
aerobioză	Etanol → acid acetic	*Acetobacter*	—
aerobioză parţială	Hexoză → 2,3-butandiol	*Klebsiella aerogenes*	pH acid, O_2 < 1 mm Hg
anaerabioză	Hexoză → etanol	*Saccharomyces cerevisiae*	pH acid
	Hexoză → glicerol + acetat		pH alcalin
METABOLIŢI PRIMARI	Vitamina B_{12}	*Propionibacterium*	Ioni de cobalt + benzimidazol ca precursori
	Acid citric	*Aspergillus niger*	pH 2, deficienţă în Fe şi Mn
	Acid glutamic	*Corynebacterium glutamicus*	Deficienţă în biotină
METABOLIŢI SECUNDARI	Benzilpenicilină	*Penicillium chrysogenum*	Fenilacetat ca precursor
	Cefalosporina C	*Cephalosporium* sp.	Metionină ca stimulator
	Toxină tetanică	*Clostridium tetani*	—
BIODERIVAŢI*)	Hidroxilare steroizi	*Rhizopus* sp.	Evoluţie în două trepte :
	D-sorbitol-L-sorboză	*Acetobacter*	1) creşterea microorganismelor 2) bioconversie **)

*) ,,Bioderivaţi" — termen propus să înlocuiască pe cel de ,,produs de transformare".
**) ,,Bioconversie" — termen utilizat în locul celui de ,,transformare" (a unui compus).

celulare. Microorganismele suferă o schimbare la începutul idiofazei, cînd diviziunea celulară încetează, aşa cum se întîmplă în bioreactoarele industriei fermentative, ca rezultat al deficitului de nutrienţi şi O_2 şi al acumulării de substanţe toxice. Deşi această fază coincide cu represia enzimelor şi cu inhibiţia prin feedback a căilor anabolice, metaboliţii intermediari continuă să se acumuleze, devenind iniţiatorii metabolismului secundar prin care sînt sintetizaţi produşii naturali activi.

Metaboliţii primari se formează în faza de creştere exponenţială a microorganismelor (trofofaza), ca rezultat al metabolismului oxidativ sau fermentativ (fig. 168). Reacţiile metabolismului primar sînt fin echilibrate, iar

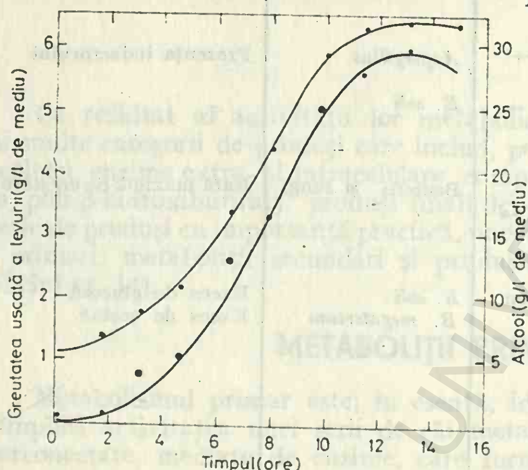


Fig. 168. — Dinamica acumulării unui metabolit primar (etanol) concomitent cu acumularea celulelor de levură, într-un bioreactor. Metabolitul primar este sintetizat de microorganism în cursul activităţilor metabolice, care menţin celulele vii şi pe cale de creştere (după Gaden Jr., 1981).

rezultatul activităţii lor, cu excepţia celor necesari pentru supravieţuirea organismelor, se acumulează numai foarte rar. Unele microorganisme produc metaboliţi primari cu importanţă industrială (aminoacizi, nucleotide, acizi organici, vitamine etc.), asigurînd un grad de supraproducţie foarte ridicat în raport cu necesarul lor propriu (tabelul nr. 34).

Tabelul nr. 34

Exemple de supraproducţie a unor metaboliţi primari ai microorganismelor (după Demain, 1980)

Produsul	Necesitatea pentru creştere*) (mg/l)	Producere **) (mg/l)	Raportul producere/ necesitate
Lizină	250	50 000	$2,0 \cdot 10^2$
Acid glutamic	300	100 000	$3,3 \cdot 10^2$
Acid inozinic	25	13 000	$5,2 \cdot 10^2$
Riboflavină	0,5	10 000	$2,0 \cdot 10^4$
Cobalamină (vitamina B_{12})	0,001	50	$5,0 \cdot 10^4$

*) Concentraţii utilizate, în general, pentru creşterea optimă a microorganismului, probabil cantitativ puţin în exces.

**) Concentraţii apropiate de cantităţile maxime descrise în literatură.

METABOLIȚII SECUNDARI

Metaboliții secundari sau „speciali" (Martin, 1978) sînt numiți „produși naturali" ai microorganismelor (Boyd-Woodruff, 1980) sau „idioliți" (J. B. Walker, 1974), deoarece, spre deosebire de metaboliții primari, sînt sintetizați în cursul idiofazei (fig. 169). În perioada respectivă, în ciuda represiei enzimelor și a inhibiției prin feedback a căilor anabolice, unii intermediari

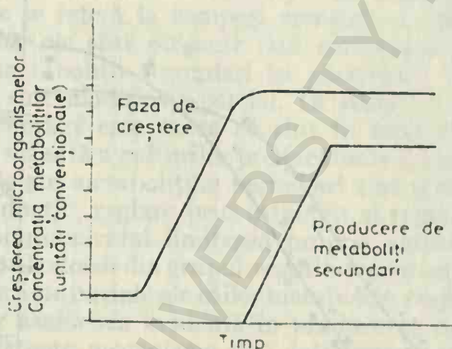


Fig. 169. — Relația dintre curba de creștere a microorganismelor și dinamica acumulării metaboliților secundari (după Weinberg, 1971).

metabolici continuă să se acumuleze. Ei servesc ca inițiatori ai metabolismului secundar (proces prin care sînt sintetizați produșii naturali, farmacologic activi), fiind încorporați direct în moleculele de produși naturali sau servind ca inductori pentru enzimele esențiale necesare sintezei acestora (Woodruff, 1980). Ca urmare, deși nu au o funcție evidentă în creșterea și multiplicarea celulelor, ei sînt produși adeseori în cantități foarte mari. Pornind de la observația că unii metaboliți primari (acid glutamic, acid citric, vitamina B_{12}) sînt produși predominant după faza de creștere și că modificarea condițiilor de mediu (nutriționale sau de altă natură) poate afecta dinamica producerii metaboliților primari și secundari, Aharonowitz și Demain (1980) consideră că definiția metaboliților secundari nu trebuie să fie legată de perioada din ciclul de creștere în care sînt produși. Metaboliții sînt „secundari" pentru că nu sînt esențiali pentru creștere și nu pentru că sînt produși după creștere.

Trofofaza este stadiul de creștere activă și idiofaza cel de producere a metaboliților secundari, dar ele nu trebuie să aibă loc în mod obligatoriu în faze diferite (succesive) în timp, ci uneori pot apărea chiar simultan. Dovada o constituie faptul că antibiotic sintetazele, ca și antibioticele, sînt produse în chemostate de celulele care cresc exponențial (Matteo și Demain, 1976), ceea ce demonstrează că trofofaza și idiofaza apar în acest caz concomitent. Separarea celor două faze în timp este în funcție de reglarea nutrițională și nu în funcție de tipul de moleculă produs. Incapacitatea metaboliților secundari de a se acumula în cursul trofofazei s-ar datora represiei enzimelor necesare pentru sinteza lor, care se realizează, cel mai frecvent, în cursul unei scurte perioade, la începutul fazei staționare de creștere, urmată, cel mai adesea, de eliminarea lor în mediu (fig. 170). Metaboliții secundari sînt produși de un număr restrîns de grupuri taxonomice de microorganisme și la acestea numai la anumite specii ale unui gen dat. Numărul metaboliților secundari este

foarte mare, iar structura lor chimică este foarte diferită și adeseori complexă. Diversitatea neobișnuită a efectelor farmacodinamice și a structurii lor chimice este ilustrată de numeroasele clase de compuși organici la care pot aparține și care includ: glucide aminate, chinone, cumarine, epoxizi, alcaloizi din familia ergotinei, glutarimide, glicozide, derivați indolici, lactone, macrolide, naftalene, nucleozide, terpenoizi și tetracicline (Walker, 1971; Berdy, 1974). Unii

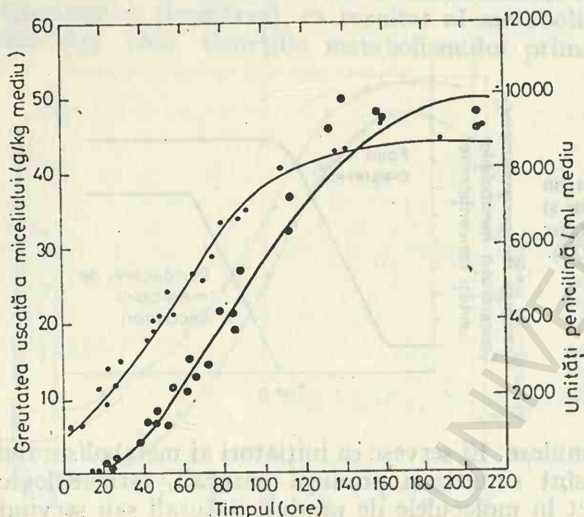


Fig. 170. — Creșterea miceliului fungic și acumularea ulterioară de penicilină, ca metabolit secundar, într-un bioreactor. Valorile de temperatură și de pH optime pentru creștere sînt rareori optime pentru sinteza de metaboliți secundari. La culturile discontinue se tinde spre un compromis între cele două categorii de condiții optime (după Gaden Jr., 1981).

metaboliți secundari includ legături chimice neobișnuite de tipul ciclului β-lactam, peptide ciclice formate din aminoacizi normali sau modificați, cicluri mari macrolidice etc. În sfîrșit, foarte mulți au aplicații practice (antibiotice, toxine, pigmenți, biostimulatori pentru creșterea plantelor etc.). Ei pot fi dăunători celulelor producătoare (ca în cazul antibioticelor) sau, din contra, le pot crea avantaje, exercitînd un efect protector, servind ca substanțe de rezervă, favorizînd sporularea sau exercitînd alte activități favorabile.

Adeseori, metaboliții secundari formează un amestec de produși cu structură asemănătoare aparținînd aceleiași familii de substanțe chimice. Există cel puțin 10 peniciline naturale, 5 mitomicine, 10 bacitracine, 20 actinomicine etc. *Streptomyces griseus* produce 40 antibiotice diferite, iar *B. subtilis* peste 60 (Demain, 1980). O caracteristică semnificativă a produșilor naturali ai microorganismelor este relația lor structurală cu produșii de metabolism de la care s-au format. Spre exemplu, agentul antitumoral Actinomicina D este înrudit cu aminoacizii precursori, iar oxitetraciclina cu malonamyl-CoA și malonil-CoA (Meyenhofer și colab., 1973). În unele cazuri, această înrudire poate fi oarecum obscură sau complicată, dar în cazul compușilor comercial importanți originea metabolică este în general evidentă.

Sinteza metaboliților secundari se face printr-o mai mare varietate de căi decît aceea a metaboliților primari, pe seama constituenților cu g.m. mică, folosiți în timpul creșterii exponențiale pentru sinteza constituenților celulari normali, și este rezultatul acumulării în mediu a unor substanțe cu rol de

inductor sau al epuizării unor substanțe cu funcție de represor. În contrast cu diversitatea căilor de biosinteză și a produșilor finali, cei mai mulți sînt asamblați pornind de la cîțiva metaboliți-cheie. De asemenea, spre deosebire de metabolismul primar, în care procesele de biosinteză se desfășoară totdeauna cu o mare specificitate (în sensul că este acceptat un simplu substrat și format un singur produs), în metabolismul secundar, proporția fiecărui component depinde de factori genetici și de mediu, probabil din cauza specificității scăzute a enzimelor implicate în desfășurarea sa. O explicație a acestor deosebiri ar putea fi aceea că în metabolismul primar erorile de biosinteză au urmări letale, deoarece se referă la compuși esențiali ai celulei, în timp ce în metabolismul secundar ele sînt obișnuit fără consecințe pentru celulele producătoare, deoarece metaboliții secundari își păstrează, adesea, activitatea biologică, chiar dacă sînt modificați parțial. În sfîrșit, o ultimă caracteristică a metaboliților secundari este aceea că sînt în mod obișnuit produși numai la o rată de creștere scăzută a culturilor producătoare („idioliți").

Căile biosintetice individuale ale metaboliților secundari sînt și ele afectate de mecanisme de reglare (inducție, reglare prin catabolit și reglare prin produs final). Spre exemplu, cloramfenicolul limitează propria sinteză prin represarea arilamin sintetazei, iar alcaloizii din grupul ergotinei prin inhibarea dimetilalil transferazei, ambele enzime inițiale ale căilor metabolice respective.

Inducția enzimatică este de asemenea evidentă în producerea de alcaloizi și antibiotice etc. Deoarece aceste mecanisme sînt determinate genetic, mutațiile au un efect major asupra randamentului producției de metaboliți secundari. Ele reprezintă, spre exemplu, principalul factor răspunzător de creșterea producției antibioticelor de 100—1 000 de ori, din momentul descoperirii lor pînă în prezent.

În esență deci, metabolismul secundar este coordonat pe două căi: a) prin mecanismele globale de reglare, care acționează ca funcții ale ratei de creștere și b) prin efectul de reglare a căilor individuale specifice.

Semnificația biologică a metaboliților secundari nu este cunoscută. Sinteza lor ar reprezenta rezultatul unor „erori de metabolism", fără importanță pentru fiziologia microorganismelor producătoare. Astfel, funcția antibiotică derivată din acțiunea compușilor respectivi nu oferă un avantaj ecologic, deoarece aceștia sînt excretați prea tîrziu în cursul ciclului de viață al microorganismului producător. După unele date experimentale însă, ei ar putea avea o importanță cu totul deosebită (tabelul nr. 35).

Pe această bază, Bushell (1983) propune modificarea definiției dată de Demain metaboliților secundari („substanțe neesențiale pentru creștere") în „substanțe care nu sînt esențiale pentru creșterea exponențială".

De asemenea, se apreciază că în ciuda eficienței mecanismelor de reglare, în cursul fazei staționare de creștere, microorganismele ar fi periclitate din cauza acumulării unor concentrații mari de compuși cu greutate moleculară mică. Formarea metaboliților secundari ar putea reprezenta un proces care atenuează aceste dificultăți, prin convertirea metaboliților intermediari acumulați în produse inofensive.

În sfîrșit, metaboliții secundari ar mai putea juca rolul de mediere a trecerii anumitor molecule prin membrana plasmatică sau de a facilita supraviețuirea microorganismelor producătoare, prin limitarea dezvoltării altor microorganisme din mediul natural.

Tabelul nr. 35

Metaboliţi secundari cu activităţi fiziologice asupra microorganismelor producătoare (după Zahner, 1977)

Metabolitul	Funcţia	Rolul posibil
Sideramine (de ex. fericromi şi ferioxamine)	Agenţi de chelatare ai ionilor Fe, Co, Ni	Preluarea ionilor Fe, Co şi Ni din mediile sărace
Antibiotice ionofore (macrolide)	Mobilizarea ionilor metalelor alcaline	Creşterea permeabilităţii selective faţă de ionii metalelor alcaline
Antibiotice implicate în sporulare (gramicidine)	Inhibă legarea ARN-polimerazei de ADN	Inhibarea selectivă a genelor metabolismului vegetativ, în favoarea celor care stimulează sporularea

PRODUŞII DE BIOCONVERSIE. BIODERIVAŢII

Bioconversia reprezintă un proces de transformare a unui produs în alt produs structural înrudit, cu ajutorul unei enzime sau al unui număr mic de enzime celulare. Una din bioconversiile cele mai vechi este aceea a etanolului la acid acetic, efectuată de către bacteria *Gluconobacter suboxydans* (Sasson, 1983). În unele cazuri, microorganismele pot cataliza numai cîteva etape dintr-un proces complex, bazat în cea mai mare parte pe sinteze chimice. În alte cazuri, bioconversiile necesită intervenţia unor culturi mixte sau succesiunea unor tulpini sau specii diferite de microorganisme pentru a realiza o anumită etapă de bioconversie. Bioconversiile sau transformările microbiene sînt caracterizate prin producţii foarte mari, randamentul lor oscilînd între 90 şi 100 %, şi se desfăşoară prin reacţii cuplate, cu ajutorul unui microorganism care conţine mai multe enzime ce lucrează în serie (Demain, 1980). Ele sînt foarte specifice, deoarece privesc o reacţie determinată şi un compus cu structură definită. Esenţa specificităţii lor şi semnificaţia pentru practică este exemplificată de bioconversia steroizilor. Spre exemplu, sinteza chimică a cortizonului implică 37 de reacţii. Hidroxilarea progesteronului şi introducerea unui atom de oxigen în poziţia 11 α a nucleului sterol de către *Rhizopus arrhizus* sau de *R. nigricans* a redus la 11 etapele de sinteză chimică şi de aproximativ patru sute de ori preţul iniţial de cost al producţiei.

Unele bioconversii au o deosebită importanţă pentru biotehnologie, deoarece permit producerea pe cale industrială a unor compuşi foarte valoroşi ca acidul gluconic, acizii cetogluconici, L-DOPA, diferiţi hormoni corticosteroizi etc. Bioconversia sorbitolului la L-sorboză reprezintă singura reacţie biologică în sinteza chimică a vitaminei C (tabelul nr. 36).

Tabelul nr. 36

Bioconversii cu importanţă practică (după Demain, 1980)

Substratul	Produsul	Microorganismul	Randamentul %
Sorbitol	Sorboză	*Gluconobacter suboxydans*	98
Manitol	Fructoză	,,	95
Glicerol	Dihidroxiacetonă	,,	95
Glucoză	Acid 5-cetogluconic	,,	90
Glucoză	Acid 2-cetogluconic	*Pseudomonas mildenbergii*	100
Glucoză	Acid gluconic	*Aspergillus niger*	97
L-tirozină	L-DOPA	*Aspergillus oryzae*	100
Progesteron	11-α-hidroxi-progesteron	*Rhizopus nigricans*	90
Cortizon	Prednison	*Corynebacterium simplex*	97
Hidrocortizon	Prednisolon	,,	95

Bioconversia a evoluat probabil ca un proces menit să ofere organismului producător un avantaj selectiv în mediul său natural (spre exemplu, bioconversia steroizilor ar putea acţiona ca un mecanism de detoxifiere).

★

În numeroase cazuri, prezenţa şi variaţiile cantitative ale anumitor factori din mediu (pH, concentraţia O_2, prezenţa unor substanţe specifice etc.) determină natura şi rata biosintezei produşilor de metabolism.

În unele cazuri, adăugarea unui precursor al produsului final stimulează sinteza lui: spre exemplu, adăugarea ca precursor a acidului fenilacetic măreşte rata de producere a antibioticului benzilpenicilină de ~ 10 ori.

În alte cazuri, deficienţele nutritive sînt importante pentru sinteza şi acumularea unor substanţe utile (producerea de acid glutamic de către *Corynebacterium glutamicus* este stimulată de deficienţa în biotină a mediului de cultură), în timp ce acumularea substanţelor de rezervă (ca glicogenul ş.a.) necesită prezenţa unui excedent de substanţe energetice.

În ultimii ani, numeroşi cercetători au evidenţiat prezenţa în lichidele de cultură ale unor microorganisme a unor metaboliţi microbieni — diferiţi de antibiotice şi citostatice — avînd activităţi fiziologice şi farmacodinamice deosebit de importante (tabelul nr. 37).

Demonstrarea faptului că lichidele de cultură ale microorganismelor conţin produşi naturali neobişnuiţi, cu o mare varietate de proprietăţi chimice şi biologice, duce la necesitatea de a-i evidenţia în continuare, prin procedee eficiente de detecţie, în vederea izolării, purificării şi utilizării în terapeutică, la om, animale şi plante. Cunoaşterea naturii lor chimice ar putea sugera orientări noi în industria chimică de sinteză şi va permite o mai bună cunoaştere a topologiei situsurilor active ale proteinelor-ţintă pe care acţionează şi a specificităţii de acţiune *in vivo*. Epoca antibioticelor ar putea evolua spre o epocă a produşilor naturali (Boyd-Woodruff, 1980).

Tabelul nr. 37

Exemple de produşi naturali farmacologic activi descoperiţi în culturi de microorganisme (după Boyd-Woodruff, 1980)

Produsul	Activitatea	Microorganismul producător
Phialocin	Anticoagulant	*Phialocephala repens*
1,3-difenetiluree	Antidepresiv	*Streptomyces* sp.
Avermectin	Antihelmintic	*Streptomyces avermitilus*
Ascofuranonă	Antilipidemic	*Ascochyta viciae*
Vitamina B_{12}	Antianemie pernicioasă	*Streptomyces griseus*
Naematolin	Vasodilatator coronarian	*Naematoloma fasciculare*
Detoxin	Detoxicant	*Streptomyces caespitosus*
Antraformin	Inhibitor al transformării ADN	*Streptomyces* sp.
Zearalenonă	Estrogen	*Gibberella zeae*
Monascină	Pigment alimentar	*Monascus* sp.
Herbicidină	Ierbicid	*Streptomyces saganonensis*
Acid fusaric	Hipotensiv	*Fusarium* sp.
N-acetilmuramyl-tripeptid	Imunostimulator	*Bacillus cereus*
Piericidină	Insecticid	*Streptomyces mobaraensis*
Tetranactină	Antiacarian	*Streptomyces aureus*
Acid giberelic	Hormon vegetal	*Gibberella fujikuroi*
Slaframina	Inductor salivar	*Rhizoctonia leguminicola*
HO_{2135}	Antagonist al serotoninei	*Streptomyces griseus*

CO-METABOLISMUL

Numeroşi compuşi organici, ca, de exemplu, pesticidele clorurate nu pot fi utilizaţi ca unică sursă de carbon şi energie de un singur microorganism, dar pot fi modificaţi pe cale biologică, în natură, prin acţiunea unor populaţii mixte de microorganisme. În aceste cazuri, nici un organism în cultură pură nu poate folosi substratul pentru creştere, dar în prezenţa unei surse alternative de carbon şi energie îl poate modifica, transformîndu-l chimic în aşa fel încît poate fi utilizat în continuare de alte organisme (Slater şi Sommerville, 1979).

Procesul prin care un substrat este modificat, fără să fie utilizat, de către un microorganism care creşte pe un alt substrat a fost descris prima oară la *Methylomonas methanica* (Leadbetter şi Foster, 1958). Această bacterie utilizează pentru creştere metanul şi oxidează concomitent alte cosubstraturi prezente în mediu, cu formare de produşi de oxidare omologi: prin oxidarea etanului se obţin etanol, acetaldehidă sau acid acetic, prin oxidarea propanului, propan-l-ol, acid propionic şi acetonă ş.a.m.d. Bacteria metanotrofă foloseşte pentru creştere numai substratul caracteristic (C_1). Ea nu poate utiliza ca unică sursă de C şi energie nici cosubstraturile şi nici produşii rezultaţi din oxidarea lor.

Foster (1962) a denumit *co-oxidare* producerea de compuşi oxidaţi din cosubstraturi în prezenţa unui alt substrat de creştere, iar Jensen (1963) a propus termenul mai larg de *co-metabolism*, pentru a include şi alte reacţii (dehalogenări etc.) şi pentru a scoate în evidenţă necesitatea prezenţei concomitente a substratului de creştere. Conceptul de co-metabolism a fost criticat de Holbert şi Krawiec (1977), care consideră că reacţiile respective nu reprezintă evenimente metabolice noi, ci aparţin anabolismului şi catabolismului normal, deşi cei mai mulţi autori consideră că el defineşte un fenomen real.

Horvath (1962) consideră ca definitorii pentru co-metabolism prezenţa obligatorie a patru caracteristici: a) cosubstratul (co-metabolitul) să nu poată asigura creşterea; b) produşii proveniţi din modificarea lui să fie acumulaţi stoichiometric; c) transformarea co-metabolitului să fie asociată cu creşterea consumului de O_2; d) implică utilizarea sistemelor enzimatice existente, de provenienţă colaterală.

Stirling şi Dalton (1979, 1982), pentru a evita criticile, propun redefinirea conceptului de co-metabolism, ca reprezentînd reacţiile de transformare ale unui substrat, care nu permite creşterea unui microorganism („non-growth substrate") în prezenţa unui substrat de creştere sau a altui compus transformabil.

Importanța în natură. Fenomenul de co-metabolism este foarte important pentru procesele de biodegradare care au loc în mediu, prin care în special diferitele hidrocarburi și derivații lor, eliberate permanent, se acumulează foarte rar, deoarece sînt degradate chimic sau biologic (servesc ca substrat de creștere sau de co-metabolism pentru microorganisme) în sol și ape. Unele molecule „recalcitrante", ca polimerii organici sintetici, persistă mult în mediu și își datorează acest comportament lipsei de enzime adecvate pentru a efectua chiar modificări minore ale substratului și incapacității acestuia de a pătrunde în celulele microbiene (Alexander, 1965, 1981). Deși este greu de apreciat în prezent cît din biodegradarea moleculelor organice revine metabolismului și cît co-metabolismului, este evident că foarte mulți compuși din categoria parafinelor ciclice nesubstituite, deși nu permit creșterea nici unui organism individual, sînt degradați în sol în prezența unor populații complexe (Beam și Perry, 1974).

Pe bază de calcul și a unor date experimentale, Conrad (1981) a demonstrat că acțiunea carboxidobacteriilor nu poate contribui semnificativ la îndepărtarea CO din atmosferă și de la suprafața solului. Cel puțin 50% din CO global, generat în fiecare an, este îndepărtat pe cale biologică (Liebl, 1976) prin co-metabolism (Alexander, 1981) de bacteriile metanotrofe care produc biotransformări și ale altor substraturi ca NH_3 și alcanii halogenați.

Mediile naturale impun frecvent condiții restrictive pentru creșterea microorganismelor, care se realizează cu o rată mult mai scăzută în comparație cu cele din laborator, sau este chiar oprită cînd concentrația nutrienților este foarte scăzută. În aceste condiții, co-metabolismul poate reprezenta o cale alternativă prin care microorganisme importante pot fi aprovizionate cu nutrienții necesari pentru creștere și activitățile lor biologice normale.

Aplicații practice. Reacțiile co-metabolismului pot fi utilizate ca tehnici biochimice pentru stabilirea modului de acțiune a enzimelor cu substrat ambiguu (Horvath, 1972), pentru elucidarea căilor metabolice de degradare a pesticidelor și altor substanțe, ca și pentru studiul mecanismelor enzimatice și al evoluției enzimelor. De asemenea, pot fi utilizate pentru producerea de compuși cu importanță industrială prin procedee biotehnologice.

Microorganismele cu proprietăți co-metabolice sînt adevărate „instrumente de secționare chimică" („chemical cutting tools", Quayle, 1980). Ele sînt folosite în prezent în industria chimico-farmaceutică pentru producerea unei game largi de steroizi modificați, pe baza proprietății lor de a-i modifica, fără a-i asimila. Această acțiune este datorită, probabil, prezenței unor enzime care acționează ca agenți detoxifianți, apărînd celulele microbiene de efectele nocive ale steroizilor (Marsheck, 1971).

Biotransformarea compușilor organici prin co-metabolism este importantă pentru industrie, fiind mult mai simplă, mai rapidă și mai puțin costisitoare, în comparație cu tehnicile chimice tradiționale (Dalton și Stirling, 1982).

METABOLISMUL ENDOGEN LA MICROORGANISME

Numeroase microorganisme pot supraviețui, uneori perioade foarte îndelungate, în absența nutrienților. În cursul înfometării, suspensiile în medii apoase de bacterii aerobe și facultativ aerobe prezintă coeficienți respiratori măsurabili, fapt care indică existența unor procese de oxidare a materialului celular, necesare, probabil, pentru a asigura producerea de energie și pentru a permite resinteza din surse de C și N, endogene a constituenților celulari esențiali care pot suferi degradări în cursul înfometării.

Metabolismul endogen — studiat în special la bacterii — este reprezentat de totalitatea reacțiilor metabolice care apar în celula vie în absența din mediu a compușilor sau elementelor care servesc în mod normal ca substraturi specifice exogene. Existența metabolismului endogen nu implică prezența obligatorie în celule a unor rezerve specializate de C și energie, deoarece el se poate manifesta și în absența acestora pe seama degradării materialelor celulare esențiale de tipul proteinelor sau al acizilor nucleici. Reacțiile caracteristice metabolismului endogen pot continua și în prezența unor substanțe nutritive în mediu, care nu au pătruns încă intracelular.

În timp ce pentru Furano și Green (1963) distincția dintre metabolismul endogen și cel exogen ar fi, în mare măsură, de ordin semantic, Dawes și Ribbons (1964), precum și Dawes (1976) îl consideră o realitate obiectivă, avînd următoarele funcții esențiale pentru supraviețuirea bacteriilor în condiții de înfometare: 1) asigură energia necesară activităților metabolice și biologice în general; 2) furnizează sursa de C necesară pentru resinteza constituenților celulari degradați; 3) permite efectuarea unor funcții speciale ca, de exemplu, furnizarea unei surse de putere reducătoare pentru unele bacterii chemolitotrofe și fototrofe; 4) acoperă nevoile de P și S la organismele care stochează polifosfat sau granule de sulf.

Fenomenul a fost descris inițial la *Pseudomonas aeruginosa*, care cultivată pe medii cu glucoză și săruri de amoniu nu face rezerve de C și consumă ARN și proteinele proprii (Campbell, Gronlund și Duncan, 1963).

SUBSTRATURILE UTILIZATE ÎN METABOLISMUL ENDOGEN

În general, metabolismul endogen se realizează pe seama compușilor de rezervă energetică de tipul polizaharidelor, lipidelor, inclusiv a incluziunilor de poli-β-hidroxibutirat, a granulațiilor de polifosfat etc. În anumite

condiţii însă, acestora li se adaugă aminoacizii liberi intracelular, precum şi unele tipuri de molecule supuse la turnover, ca, de exemplu, ARN şi proteinele celulare, respectiv compuşi care reprezintă materiale esenţiale, nu compuşi de rezervă sau de depozit.

Rolul substanţelor de rezervă. Numeroase microorganisme pot acumula substanţe de rezervă de tipul poliglucanilor („glicogen"), lipide, polifosfat etc., în condiţiile în care găsesc în mediu blocurile de construcţie necesare pentru sintezele de rezervă şi cînd sursa de N este fie epuizată, fie indisponibilă pentru creştere. Aceste substanţe reprezintă rezerve de C, P şi/sau energie, care, în condiţii de înfometare, pot furniza celulei sursele de C necesare pentru resinteza constituenţilor celulari degradaţi şi de energie pentru menţinerea viabilităţii (Dawes şi Senior, 1973).

Atît sinteza substanţelor de rezervă, cît şi metabolismul endogen sînt strîns corelate cu compoziţia chimică a microorganismelor şi, prin aceasta, indirect cu condiţiile de mediu. Spre exemplu, cultivarea *E. coli* pe medii cu acetat şi săruri de NH_4^+ stimulează acumularea lipidelor şi inhibă pe aceea a polizaharidelor, în timp ce creşterea pe glucoză are un efect invers. Unele microorganisme stochează mai multe tipuri de materiale de rezervă, în proporţii determinate de mecanisme de reglare încă incomplet elucidate.

Ca regulă generală, în cursul înfometării, rezervele sînt consumate treptat, celulele care conţin cantităţi mai mari de polimeri avînd o supravieţuire mai îndelungată, deoarece sînt mai rezistente la condiţiile care duc la autoliză şi moarte.

Rolul glicogenului. Numeroase specii de bacterii acumulează, în prezenţa unui exces de energie şi de C, cînd creşterea este limitată de N, S, P şi de scăderea pH, poliglucani *similari glicogenului*. *E. coli* utilizează rapid în metabolismul endogen aceste rezerve ca sursă primară de C şi energie necesară pentru reîncorporarea NH_3, eliberat prin degradarea proteinelor celulare în cursul înfometării (Wilkinson şi Munro, 1967) şi pentru a anihila efectul toxic al NH_3. Numai după ce glicogenul a fost epuizat începe utilizarea proteinelor (Ribbons şi Dawes, 1963).

Volutina — respectiv depozitele de polifosfat anorganic — se acumulează în condiţii de sinteză a ATP în exces faţă de necesităţile celulare pentru biosinteză şi menţinere. În această situaţie, excesul de ATP este utilizat pentru sinteza de polifosfat cu rolul de stocare a ~ P sau de disipare a ATP, cu regenerarea de ADP şi Pi.

După Harold (1963, 1966), Dawes şi Senior (1973), care au studiat factorii ce influenţează acumularea şi utilizarea rezervelor de polifosfat, bacteria *Enterobacter aerogenes* (anterior denumită *Aerobacter aerogenes* — Bergey, 1974) utilizează numai o mică parte din ATP disponibil, astfel că polifosfatul ar avea numai o mică importanţă pentru metabolismul energetic, rolul principal fiind mai degrabă de rezervă de P şi de menţinere a unui echilibru al P intracelular.

Experienţele demonstrează că în celula bacteriană ar exista o competiţie între acizii nucleici şi polifosfat pentru fosforul intracelular: polifosfatul se acumulează numai după ce sinteza de acizi nucleici a încetat, în timp ce reluarea sintezei de acizi nucleici determină degradarea rapidă a polifosfatului cu transferul fosforului la ARN (Harold şi Sylvan, 1963).

Rolul poli-β-hidroxibutiratului (PHB) este în esență acela de rezervă de C și de energie. Bacteriile bogate în PHB (50% din masa celulară) rămîn 100% viabile în condiții de înfometare în tampon fosfat timp de 100 de ore, în timp ce cele sărace în PHB (10% rezervă) prezintă mai puțin de 10% supraviețuitori după 30 de ore. Au fost semnalate și unele excepții de bacterii cu conținut scăzut de PHB care supraviețuiesc mai mult decît cele bogate, probabil datorită utilizării mai eficiente a acestor rezerve sau absenței unor factori de mediu adverși, adiționali.

La unele bacterii fixatoare de N_2 *(Azotobacter)*, rezervele de PHB pot juca un rol suplimentar de regulator redox, în prezența unor concentrații de O_2 dăunătoare pentru sistemul enzimatic al nitrogenazei. În prezența PHB și absența unui substrat exogen (respectiv în condițiile metabolismului endogen), bacteriile își măresc activitățile oxidative, fapt care determină scăderea presiunii parțiale a O_2 la valori tolerabile de către nitrogenază. Prin acest mecanism, numit de Dalton și Postgate (1969) *protecție respiratorie*, sistemul enzimatic al nitrogenazei este protejat de inactivarea indusă de concentrația ridicată de O_2, fapt care mărește perioada de supraviețuire a bacteriilor. Rezervele intracelulare de energie în general sînt inițial degradate sub acțiunea enzimelor depolimerizante la monomeri (zaharuri, acizi grași, β-hidroxibutirat etc.), care după aceea sînt preluați de către căile specifice de utilizare intracelulară.

Un exemplu tipic este furnizat de calea de utilizare a PHB descrisă la *Azotobacter beijerinckii* (fig. 171), în care sub acțiunea enzimei depolimeri-

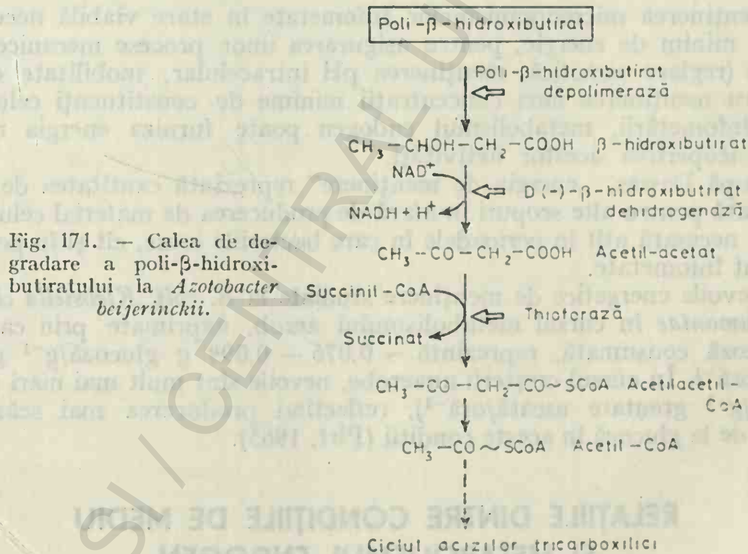


Fig. 171. — Calea de degradare a poli-β-hidroxibutiratului la *Azotobacter beijerinckii*.

zante se formează inițial D(—)-3-hidroxibutirat. Acesta este convertit la acetoacetat printr-o reacție catalizată de D(—)-3-hidroxibutirat dehidrogenaza, NAD^+ dependentă. În faza următoare, acetoacetatul este convertit la acetoacetil-CoA, sub acțiunea enzimei thioforaza, pentru ca în cele din urmă acetil-CoA să intre în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul lui Krebs), în care devine o sursă de ATP.

ROLUL MOLECULELOR ESENȚIALE ÎN METABOLISMUL ENDOGEN BACTERIAN

În cursul înfometării, proteoliza este mai generalizată și mai uniformă, dar nu în mod obligatoriu mai intensă decît în faza de creștere, deoarece în celulele care cresc are loc o resinteză continuă a proteinelor labile. Cercetările efectuate pe *Sarcina lutea* au demonstrat că în primele cinci ore de înfometare conținutul în lipide și glucide este puțin modificat, în timp ce rezerva de aminoacizi liberi scade la jumătate și o cantitate echivalentă de NH_3 este eliberată în mediu. În acest proces sînt utilizați numai anumiți aminoacizi (în special acidul glutamic). Rezerva de aminoacizi liberi intracelulari nu este refăcută în cursul înfometării prin degradarea proteinelor, ci numai în caz de transfer pe un mediu nutritiv adecvat.

Degradarea ARN citoplasmatic produce riboză, baze purinice și pirimidinice care, în funcție de natura microorganismului dat, pot fi folosite sau nu ca substrat endogen.

Un rol esențial pentru menținerea viabilității și supraviețuire în condiții de înfometare îl are magneziul, esențial pentru stabilizarea ribosomilor (ca Mg^{2+}), prin funcția de cofactor al enzimelor și datorită efectului stabilizator asupra unor mecanisme de control.

ENERGIA DE SUPRAVIEȚUIRE ȘI MENȚINERE

Menținerea microorganismelor înfometate în stare viabilă necesită un consum minim de energie, pentru asigurarea unor procese mecanice și biochimice (reglare osmotică, menținerea pH intracelular, mobilitate etc.), ca și pentru menținerea unei concentrații minime de constituenți celulari. În cursul înfometării, metabolismul endogen poate furniza energia necesară pentru acoperirea acestor activități.

După Dawes, „energia de menținere" reprezintă cantitatea de energie consumată pentru alte scopuri în afară de producerea de material celular nou. Ea este necesară atît în perioadele în care bacteriile cresc, cît și în perioadele cînd sînt înfometate.

Nevoile energetice de menținere studiate la *E. coli, Klebsiella cloacae* și *K. pneumoniae* în cursul metabolismului aerob, exprimate prin cantitatea de glucoză consumată, reprezintă $\sim$ 0,076 — 0,094 g glucoză/g^{-1} greutate uscată/oră$^{-1}$. În cursul creșterii anaerobe, nevoile sînt mult mai mari (0,473 g glucoză/g^{-1} greutate uscată/oră$^{-1}$), reflectînd producerea mai scăzută de energie de la glucoză în aceste condiții (Pirt, 1965).

RELAȚIILE DINTRE CONDIȚIILE DE MEDIU ȘI METABOLISMUL ENDOGEN

Condițiile de mediu joacă un rol important în evoluția metabolismului endogen, putînd determina efecte profunde asupra sa.

Studiile asupra bacteriilor care au o supraviețuire îndelungată în mediu au arătat că ele sînt caracterizate printr-o rată foarte scăzută a metabolismului endogen. Substanțele de rezervă energetică măresc durata de supra-

vieţuire numai dacă sînt degradate cu o rată scăzută, asigurînd producerea de ATP la nivelul unor cantităţi minime, compatibile cu nevoile de menţinere ale celulei. Dacă metabolismul este intens şi rapid se face risipă de energie şi bacteriile mor mult mai repede. Studiul microorganismelor provenite din diferite medii naturale demonstrează, spre exemplu, că evoluţia a selectat bacterii cu particularităţi de metabolism endogen, corelate cu perspectivele de supravieţuire adecvate mediului respectiv. Astfel, bacteriile care trăiesc în mod normal în medii cu alternanţă repetată de bogăţie în substanţe nutritive şi foame (ca, de exemplu, cele din cavitatea bucală sau intestin) au, de regulă, un metabolism endogen mai intens şi mai rapid decît cele din sol, care sînt dependente de o concentraţie mai scăzută de nutrienţi şi de un ritm foarte rar şi incert de alternanţă cu perioadele bogate în nutrienţi. Nu se ştie însă, dacă aceste particularităţi sînt determinate de unele mecanisme de reglare sau dacă sînt rezultatul activităţii unor enzime modificate în acest sens.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

AHARONOWITZ, Y., DEMAIN, A. L., 1980, *Thoughts on secondary metabolism.* Biotech. & Bioeng., **XXII**, suppl. 1, 5–9.

ALEEM, M. I. H., 1965, *Coupling of energy with electron transfer reactions in chemolithotrophic bacteria.* Symposium of the Society for General Microbiology. XV. „Structure and function in microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 351–381.

BAUER, D. W., 1981, *Infection of legumes by Rhizobia.* Ann. Rev. Plant. Physiol., **32**, 407–449.

BEAM, H. W., PERRY J.J., 1973, *Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons.* Arch. Microbiol., **91**, 87–90.

BENEMAN, J. R., VALENTINE, R. C., 1972, *The pathways of nitrogen fixation.* Advances Microbiology and Physiology, vol. 8, ROSE, A. H., TEMPEST, D. W. (eds.), Academic Press, Londra–New York.

BERINGER, J. E., BREWIN, N., JOHNSTON, A. W. B., SCHULMAN, H. M., HOPWOOD, D. A., 1979, *The Rhizobium–legume symbiosis.* Proc. R. Soc. Lond., B, **204**, 219–233.

BERINGER, J. E., 1980, *The development of Rhizobium genetics.* J. Gen. Microbiol., **116**, 1–7.

BOOS, W., 1974, *Bacterial transport.* Ann. Rev. Biochem., **43**, 123–146.

BOWIEN, B., SCHLEGEL, H. G., 1981, *Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **35**, 405–452.

BRILL, J. W., 1975, *Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation.* Ann. Rev. Microbiol., **29**, 110–129.

BRILL, J. W., 1977, *Biological nitrogen fixation.* Sci. Amer., **236**, 68–81.

BRILL. W. J., 1980, *Biochemical genetics of nitrogen fixation.* Microbiol. Rev., **44**, 449–467.

BRITTEN, R.J., 1965, *The concentration of small molecules within the microbial cell.* Symposium of the Society for General Microbiology, XV. „Function and structure in microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 57–88.

CHRISTENSEN, H. N., 1981, *Membrane domination of biological energy exchanges.* Perspectives in Biology and Medicine, p. 358–373.

COLBY, J., DALTON, H., WHITTENBURY, R., 1979, *Biological and biochemical aspects of microbial growth on C_1 compounds.* Ann. Rev. Microbiol., **33**, 482–517.

DALTON, H., MORITENSEN, L. E., 1972, *Dinitrogen (N_2) fixation (with a biochemical emphasis).* Bacteriol. Rev., **36**, 231–260.

DALTON, H., STIRLING, D. I., 1982, *Co-metabolism.* Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, **297**, 481–496.

DAWES, E. A., 1964, *Nutritional and environmental factors affecting the endogenous metabolism of bacteria.* Proc. Nutrition. Soc., , **23**, 163–170.

DEMAIN, A. L., 1980, *The astonishing synthetic versatility of microorganisms.* Biotech. Lett., **2**, *4*, 113–118.

DEMAIN, A. L., 1980, *Microbial production of primary metabolites.* Naturwissenschaften, **67**, 582–587.

DELWICHE, C.C., BRYAN, B. A., 1976, *Denitrification,* Ann. Rev. Microbiol., **30**, 241–262.

DILL, S. S., APPERSON, A., SCHMIDT, M. R., SAIER, Jr. M. H., 1980, *Carbohydrate transport in bacteria.* Microbiol. Rev., **44**, 385–418.

DILWORTH, M. J., 1974, *Dinitrogen fixation.* Ann. Rev. Plant. Physiol., **25**, 81–114.

EVANS, M. C. W., WHATLEY, F. R., 1970, *Photosynthetic mechanisms in prokaryotes and eukaryotes.* Symposium of the Society for General Microbiology. XX. „Prokaryotic and eukaryotic cells". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 203–220.

FOX, C.F., 1972, *The structure of cell membranes.* Sci. Amer., **226**, 31–38.
FRENKEL, A. W., 1970, *Multiplicity of electron transport reactions in bacterial photosynthesis.* Biological Reviews, **45**, 569–616.
FUCHS, G., STUPPERICH, E., EDEN, G., 1980, *Autotrophic CO_2 fixation in Chlorobium limicola. Evidence for the operation of a reductive tricarboxylic acid cycle in growing cells.* Arch. Microbiol., **128**, 64–71.
GARLAND, P. B., 1977, *Energy transduction and transmission in microbial systems.* Symposium of the Society for General Microbiology. XXVII. ,,Microbial energetics", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 1–21.
GOVINDJEE, GOVINDJEE, R., 1977, *The absorption of light in photosynthesis.* Sci. Amer., **231**, 68–82.
GUTSCHICK, V. P., 1978, *Energy and nitrogen fixation.* BioScience, **28**, 571–574.
HAROLD, F. M., 1972, *Conservation and transformation of energy by bacterial membranes.* Bacteriol. Rev., **36**, 172–230.
HADDOCK, A. B., JONES, C. W., 1977, *Bacterial respiration.* Bacteriol. Rev., **41**, 47–99.
HADDOCK, A. B., 1980, *Microbial energetics.* Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, **290**, 329–339.
HAMKALO, B. A., MILLER, Jr. O. L., 1973, *Vizualization of genetic transcription in gene expression and its regulation.* Plenum Publ. Co., New York, p. 63–74.
HAMKALO, B. A., MILLER, Jr. O. L., 1973, *Electron microscopy of genetic activity.* Ann. Rev. Biochem., **42**, 379–396.
HARRIS, D. A., 1982, *How ATP is made.* Biochemical Education, **10**, 50–56.
HASTINGS, J. W., 1976, *Bioluminescence.* Oceanus, **19**, *2*, 17–27.
HASTINGS, J. W., NEALSON, K. H., 1977, *Bacterial bioluminescence.* Ann. Rev. Microbiol., **31**, 549–595.
HENDERSON, R., UNWIN, P. N. T., 1975, *Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.* Nature, New Biology, **257**, 28–32.
HINKLE, P. C., MCCARTY, R. E., 1978, *How cells make ATP.* Sci. Amer., **238**, 104–123.
HOLTER, H., 1965, *Passage of particles and macromolecules through cell membranes.* Symposium of the Society for General Microbiology. XV. ,,Function and Structure in microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 89–114.
HORVATH, R.S., 1972, *Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature.* Bacteriol. Rev., **36**, 146–155.
HULBERT, M. H., KRAWIEC, S., 1977, *Co-metabolism: a critique,* J. Theoret. Biol., **69**, 287–291.
HUTNER, S. H., 1972, *Inorganic nutrition.* Ann. Rev. Microbiol., **26**, 314–346.
JONES, O. T. G., 1977, *Electron transport and ATP synthesis in the photosynthetic bacteria.* Symposium of the Society for General Microbiology. XXVII. ,,Microbiol Energetics", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 63–79.
JONSON, F. H., SHIMOMURA, O., 1975, *Bacterial and other ,,Luciferins".* BioScience, **25**, 718–722.
KABACK, H. R., HONG, J. S., 1973, *Membranes and transport.* Critical Reviews in Microbiology, **2**, 333–376.
KELLY, P. D., 1967, *Problems of the autotrophic microorganismus.* Sci. Progr., Oxford, **55**, 35–51.
KELLY, P. D., 1971, *Autotrophy: Concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism.* Ann. Rev. Microbiol., **25**, 177–210.
KEPES, A., 1973, *Trois clases de systemes de transport chez les bactéries.* Biochimie, **55**, 693–702.
KNOWLES, R. , 1982, *Denitrification.* Microbiol. Rev., **46**, 43–70.
KONINGS, W. N., VELSKAMP, H., 1983, *Energy transduction and transport mechanisms in relation to environments occupied by microorganisms.* 34 th Symposium of the Society for General Microbiology. ,,Microbes in their Natural Environments", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 153–186.
KUZNETSOV, S. I., DUBININA, G. A., LAPTEVA, N. A., 1979, *Biology of oligotrophic bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **33**, 377–387.
LAGUNAS, R., 1982, *What is meant by facultative anaerobes.* Biochemical Education, **10**, 141–142.
LAMPEN, J. O., 1972, *Mechanisms of enzyme secretion by microorganisms.* Biotechnol. & Bioeng. Symp., **3**, 37–41.
LASCELLES, J., 1965, *Comparative aspects of structures associated with electron transport.* Symposium of the Society for General Microbiology. XV. ,,Function and structure in Microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 36–56.
LURIA, S., 1973, *Colicins and the energetics of cell membranes.* Sci. Amer., **233**, 30–37.
MATIN, A., 1978, *Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **32**, 433–468.
MACARIO, A. J. L., CONWAY, E., 1982, *The immunology of methanogens: a new development in microbial biotechnology.* Immunology Today, **3**, 279–284.

MAH, R. A., WARD, D. M., BARESI, L., GLASS, T. L., 1977, *Biogenesis of methane*. Ann. Rev. Microbiol., **31**, 309–341.

MAH, R. A., 1982, *Methanogenesis and methanogenic partnerships*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, **297**, 599–616.

MCCARPA, F., 1973, *The chemistry of bioluminescence*. Endeavour, **32**, 139–145.

MEYER, O., 1980, *Using carbon monoxide to produce single-cell protein*. BioScience, **30**, 405–407.

MEȘTER, R., 1979, *Biologie celulară. I. Membrana plasmatică celulară*. Universitatea București.

MILLER, Jr. O. L., HAMKALO, B. A., 1972, *Visualization of RNA synthesis on chromosomes*. Int. Rev. Cytol., **33**, 1–25.

MILLER, K. R., 1979, *The photosynthetic membrane*. Sci. Amer., **241**, 100–111.

MITCHELL, P., *Epilogue: from energetic abstraction to biochemical mechanisms*. Symposium of the Society for General Microbiology. XXVII. „Microbial energetics", Cambridge Univ. Press., Londra, p. 383–421.

MITCHELL, P., 1957, *A general theory of membrane transport from studies of bacteria*. Nature (London) **180**, 134–140.

MITCHELL, P., 1962, *Metabolism, transport and morphogenesis: which drives which*. J. Gen. Microbiol., **29**, 23–37.

MITCHELL, P., 1967, *Translocations through natural membranes*. Adv. Enzymol., **29**, 33–88.

MITCHELL, P., 1970, *Membranes of cells and organelles: morphology, transport and metabolism*. Symposium of the Society for General Microbiology. XX. „Prokaryotic and Eukaryotic Cells". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 121–166.

NEALSON, K. H., HASTINGS, J. W., 1979, *Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance*. Microbiol. Rev., **43**, *4*, 496–518.

OESTERHELT, D., 1976, *Bacteriorhodopsin as an example of a light driven proton pump*. Angewandte Chemie, **15**, 17–24.

PALADE, G., 1975, *Intercellular aspects of the process of protein synthesis*. Science, **189**, 347.

PAYNE, W. J., *Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms*. Bacteriol. Rev., **37**, 409–452.

PECK, D. H., 1968, *Energy-coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **22**, 489–518.

PFENNIG, N., 1977, *Phototrophic green and purple bacteria; a comparative systematic survey*. Ann. Rev. Microbiol., **31**, 275–290.

PICHINOTY, F., 1973, *La réduction bactérienne des composés oxygénés mineraux de l'azote*. Bull. Inst. Pasteur (Paris), **71**, 317–395.

POLLOCK, M. R., 1963, *Exoenzymes*. În: *The bacteria*, GUNSALUS I.C., STANIER R. Y. (eds.), Acad. Press, New York, p. 121–178.

POSTGATE, J. R., 1982, *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

PREVOT, A. R., 1980, *Recherches récentes sur les bactéries méthanogènes*. Bull. Inst. Pasteur, Paris, **2**, 218–265.

PRINS, R. A., 1979, *Methanogenesis in the gastrointestinal tract of ruminants and man*. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol., **45**, 339–345.

QUAYLE, R. J., FERENCI, T., 1978, *Evoluationary aspects of autotrophy*. Microbiol. Rev., **42**, 251–273.

RITTENBERG, S. C., 1972, *The obligate autotroph — the demise of a concept*. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol., **38**, 457–478.

ROBERTS, G. P., BRILL, W. J., 1981, *Genetics and regulation of nitrogen fixation*. Ann. Rev. Microbiol., **35**, 207–235.

SAFRANY, D. R., 1974, *Nitrogen fixation*. Sci. Amer., **231**, 64–80.

SATIR, B., 1975, *The final steps in secretion*. Sci. Amer., **233**, 29–37.

SĂLĂGEANU, N., ATANASIU, L., 1972, *Realizări și perspective în fotosinteză*. În *Realizări și perspective în biologie*. SSB București.

SĂLĂGEANU, N., ATANASIU, L., 1981, *Fotosinteza*. Edit. Academiei, București.

SHANMUGAM, K. T., VALENTINE, R. C., 1975, *Molecular biology of nitrogen fixation*. Science, **187**, 919–924.

SHILO, M., 1982, *Photosynthetic microbial communities in aquatic ecosystems*. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, **297**, 565–574.

STANIER, R. Y., 1977, COHEN-BAZIRE, G., *Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **31**, 225–274.

STEWART, W. D. P., 1973, *Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., **27**, 283–316.

STEWART, W. D. P., 1976, *Nitrogen fixation*. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, **274**, 341–358.

STEWART, W. D. P., 1977, *Present-day nitrogen. Fixing Plants*. Ambio, **6**, 166–173.

STEWART, W. D. P., 1980, *Some aspects of structure and function in N_2 fixing cyanobacteria*. Ann. Rev. Microbiol., **34**, 497–536.

Stoeckenius, W., 1976, *The purple membrane of salt-loving bacteria*. Sci. Amer., **234**, 38—46.
Suzuki, I., 1974, *Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling*. Ann. Rev. Microbiol., **28**, 85—100.
Thaver, R. K., Jungermann, K., Decker, K., 1977, *Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria*. Bacteriol. Rev., **41**, 100—180.
Topală, N. D., 1982, *Microorganismele metilotrofe și importanța lor pentru industria de biosinteză*. Lucrările celui de-al treilea simpozion de microbiologie industrială, București, p. 31—46.
Topală, N., Kiss, S., 1982, *Metanogeneza bacteriană*. În *Investigații în domeniul energiei*. (sub red. Mercea, V. și colab.) Dacia, Cluj-Napoca, p. 223—243.
Trotsenko, Y. A., 1983, *Metabolic features of methane and methanol-utilizing bacteria*. Acta Biotechnol., **3**, 269—277.
Werber, M. A., 1980, *Halophilism*. Biochimie, **62**, 411—422.
Whittenbury, R., Kelly, D. P., 1977, *Autotrophy: a conceptual Phoenix*. Symposium of the Society for General Microbiology. XXVII. „Microbial energetics", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 121—149.
Wiseman, A. (ed.), 1983, *Principles of biotechnology*. Surrey Univ. Press, New York.
Wolk, C. P., 1973, *Physiology and cytological Chemistry of blue-green algae*. Bacteriol. Rev., **37**, 32—101.
Zarnea, G., 1982, *Microorganismele, ingineria genelor și viitorul biotehnologiilor*. Lucrările celui de-al treilea simpozion de microbiologie industrială, București, p. 18—30.
Zavarzin, G. A., Nozhev-Nikova, A. N., 1977, *Aerobic carboxidobacteria*. Microbiol. Ecol., **3**, 305—326.

STOECKENIUS, W., 1976, *The purple membrane of salt-loving bacteria*, Sci. Amer. 234, 38–46.
SYKES, J., 1971, *Mechanisms of* [illegible], Adv. Microbial. [illegible] 23, 83–100.
[illegible], Bacteriol. Rev. [illegible]
[illegible]
[illegible] 1–40.
[illegible]
[illegible], Acta [illegible], 3, 209–277.
WAKSMAN, S. A., 1950, [illegible]
WHITTENBURY, R., KELLY, D. P., 1977, *Autotrophy: a conceptual phoenix*, Symposium of the Society for General Microbiology, XXVII, Microbial Energetics, Cambridge Univ. Press, London, p. 121–149.
[illegible] (ed.), 1958, *Principles of* [illegible], [illegible] Univ. Press, New York.
[illegible], 1977, [illegible] *Chemistry of the green* [illegible], 77, 1–101.
[illegible], G., 1982, [illegible]
ZAVARZIN, G. A., NOZHEVNIKOVA, A. N., 1977, *Aerobic carboxydobacteria*, Microbial Ecol., 3, 305–326.

CREȘTEREA ȘI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

„Ceea ce încearcă să facă fără întrerupere o bacterie sînt două bacterii. Iată, pare-se, singurul său țel, singura sa ambiție. Visul fiecărei celule : să devină două celule".

F. JACOB

CREŞTEREA ŞI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

(Pl. 29—56)

Ca rezultat al metabolismului de biosinteză, celulele bacteriene, ca şi celelalte microorganisme, cresc prin formare de noi constituenţi celulari, apoi se multiplică. Înţelegerea evoluţiei acestui proces este importantă atît din punct de vedere teoretic (privind dinamica şi particularităţile creşterii, mecanismului diviziunii, ratei creşterii şi factorilor care o influenţează etc.), cît şi pentru activităţile de ordin practic legate de utilizările biotehnologice ale microorganismelor. Obţinerea de biomasă bacteriană, de produşi de fermentaţie sau de produşi secundari de metabolism cu randament maxim se realizează în condiţii de cultură deosebite şi, de aici, necesitatea de a dirija creşterea şi multiplicarea pe căi diferite, în acord cu necesităţile.

CREŞTEREA BACTERIILOR

Prin creştere—în sens biologic—se înţelege mărirea coordonată a tuturor constituenţilor chimici ai unui organism uni- sau pluricelular, ca rezultat al adăugării de substanţă nouă. Acest proces este rezultatul sintezei specifice, echilibrate, pornind de la substanţele nutritive din mediu, a unor compuşi noi, care apoi sînt asamblaţi pentru a forma copii fidele ale constituenţilor celulari. Specificitatea lui este determinată de intervenţia unor mecanisme de control genetic. Pe de altă parte, procesul de creştere depinde, în evoluţia sa, de natura şi concentraţia substanţelor nutritive din mediu şi de aprovizionarea continuă a celulei cu energia necesară reacţiilor endotermice de sinteză.

Creşterea bacteriilor se realizează, după caz, prin depunerea predominant uni-, bi- sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea evidentă a celulei în sensul uneia din dimensiunile ei (în cazul creşterii polare sau bipolare) sau în sensul tuturor celor trei dimensiuni (lungimea, lăţimea şi grosimea). După Lamanna (1949), dacă se face abstracţie de acţiunea forţelor externe care o pot deforma, celula bacteriană reflectă, prin forma ei, viteza relativă de creştere de-a lungul celor trei dimensiuni, unele celule avînd capacitatea de a creşte mai rapid în sensul axului lung decît în lăţime (fig. 172).

Mărirea masei totale nu reflectă în mod obligatoriu creşterea normală, echilibrată, deoarece ea poate rezulta din sinteza şi acumularea de materiale de rezervă (glicogen, poli-β-hidroxibutirat), în absenţa sintezei biopolimerilor esenţiali (ADN, ARN, proteine). Mărirea volumului celular se poate face la bacterii nu numai prin sinteza de substanţă organică, ci şi prin sporirea accen-

tuată a conţinutului lor în apă. Astfel, la *Proteus vulgaris*, unei creşteri în volum de cinci ori îi corespunde o creştere în greutate uscată de numai două ori.

Creşterea bacteriilor nu se face la infinit, deoarece se ajunge la un moment critic, cînd este întreruptă fiind urmată de diviziunea celulei. În felul acesta,

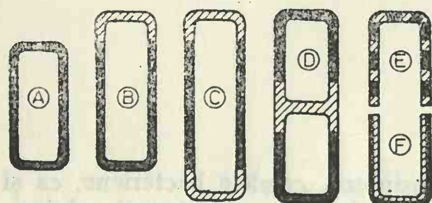


Fig. 172. — Reprezentarea schematică a diferitelor modalităţi teoretice de creştere a celulei bacteriene, prin adăugarea de constituenţi noi (zona haşurată) la peretele celular normal (în negru). **A.** Perete celular în faza premergătoare creşterii. **B.** Creştere limitată la una din extremităţi. **C.** Creştere la ambele extremităţi. **D.** Creştere în vecinătatea septului transversal. **E.** Creştere prin intussuscepţiune. **F.** Creştere prin întinderea peretelui celular şi depunerea de material nou pe suprafaţa internă.

creşterea unei populaţii bacteriene este rezultatul creşterii şi diviziunii microorganismelor individuale care formează populaţia respectivă. Datorită dimensiunilor mici şi a dificultăţilor de a le observa şi măsura, se cunosc mai puţine date despre creşterea microorganismelor ca indivizi, decît ca populaţii.

ROLUL RAPORTULUI SUPRAFAŢĂ/VOLUM ÎN LIMITAREA CREŞTERII

Numeroşi cercetători au fost preocupaţi de natura factorilor care determină oprirea creşterii şi declanşarea procesului de diviziune. Iniţial s-a crezut că încetarea creşterii ar fi datorită unor factori intrinseci, controlaţi genetic, iar diviziunea ar fi rezultatul unei modificări a raportului normal dintre masa citoplasmei şi aceea a substanţei nucleare. O altă ipoteză, aceea că încetarea creşterii ar fi determinată de epuizarea substanţelor nutritive din mediu sau de acumularea în el a unor cataboliţi toxici, a fost infirmată de observaţia că în aceeaşi cultură coexistă celule de vîrste diferite (tinere, adulte, pe cale de diviziune, bătrîne etc.). Se admite astăzi mai curînd că activitatea normală a bacteriilor este condiţionată de existenţa unui anumit raport între volumul celulei, care consumă, şi suprafaţa ei, prin care se face absorbţia substanţelor nutritive şi eliminarea cataboliţilor.

În cursul creşterii celulei bacteriene, raportul suprafaţă/volum se modifică datorită faptului că în timp ce suprafaţa bacteriilor creşte cu o raţie pătratică, volumul ei se măreşte cu o raţie cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeţei celulare. Aportul de material nutritiv din mediu devine astfel din ce în ce mai puţin adecvat exigenţelor metabolice. Pe de altă parte, pe măsură ce dimensiunile celulei se măresc, echilibrul ei chimic se alterează: concentraţia unor compuşi scade, în timp ce alţii se acumulează, întrucît circulaţia substanţelor prin difuzie în ambele sensuri — spre interior şi spre exterior — devine mai dificilă. Datorită acestor fenomene, atunci cînd disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un anumit punct critic, raportul lor adecvat se restabileşte prin diviziunea celulei ajunsă la limita ei de creştere. În felul acesta, diviziunea celulară este prin ea însăşi o formă necesară de reglare a activităţii celulei bacteriene.

Celulele bacteriene care cresc ca masă şi volum nu îşi măresc proporţional toate dimensiunile. La bacteriile cilindrice, de regulă în timpul creşterii echilibrate, indiferent de rata specifică de creştere, diametrul cilindrului rămîne fix, în aşa fel încît creşterea de volum este datorită numai creşterii în lungime a celulei. Alungirea cilindrului este corelată cu o scădere continuă a raportului suprafaţă/volum $\left(\frac{S}{V}\right)$ (Marr, 1966; Previc, 1970). Diviziunea are drept urmare revenirea la raportul $\frac{S}{V}$ de la începutul ciclului. În cazul celulelor asociate în lanţuri sau în alte grupări (tetrade, sarcina, stafilococ etc.), suprafeţele potenţiale corespunzînd zonelor de contact sînt „mascate", în aşa fel încît raportul $\frac{S}{V}$ este mult mai mic decît în cazul celulelor separate. Revenirea lor la valoarea normală a raportului $\frac{S}{V}$ se face numai prin separarea ca bacterii individuale (septarea care însoţeşte diviziunea nu este suficientă).

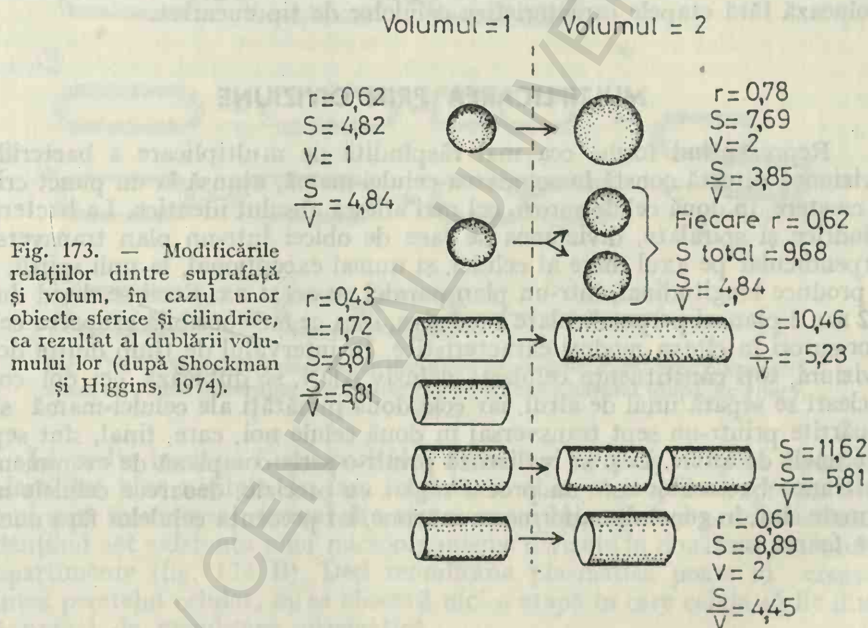


Fig. 173. — Modificările relaţiilor dintre suprafaţă şi volum, în cazul unor obiecte sferice şi cilindrice, ca rezultat al dublării volumului lor (după Shockman şi Higgins, 1974).

Pentru a ilustra modificarea raportului $\frac{S}{V}$ la bacili şi coci în cursul creşterii, Shockman şi colab. (1974) au ales, pentru simplitate, forma de cilindru, cu extremităţile tăiate drept, avînd iniţial raportul de 4 : 1 între lungime şi rază, şi sfera perfectă. În fiecare caz, a urmărit efectul dublării volumului asupra raportului $\frac{S}{V}$. În cazul cocilor, dublarea volumului are ca rezultat o creştere cu 27 % a razei şi cu ~ 60 % a suprafeţei. Dublarea volumu-

lui aceleiaşi sfere iniţiale, urmată de separarea în două sfere, dublează suprafaţa şi menţine în acelaşi timp raportul $\frac{S}{V}$ iniţial. În cazul bacteriilor cilindrice, dublarea lungimii, cu păstrarea unei raze constante, dublează volumul. Suprafaţa nu se dublează decît după separarea celor doi bacili. Dublarea volumului se poate realiza şi cu o creştere a razei cu 40%, căreia îi corespunde însă numai o creştere de ~ 53% a suprafeţei (fig. 173).

MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Se poate realiza prin diviziune directă (diviziune simplă sau binară), prin înmugurire, prin fragmentare sau prin formarea unui tip special de spori (de propagare), în funcţie de natura diferitelor specii de bacterii. Perioada care include creşterea unei celule, din momentul formării ei pînă în acela al separării consecutive diviziunii, este cunoscută sub denumirea de *ciclu celular* şi evoluează fără etapele caracteristice celulelor de tip eucariot.

MULTIPLICAREA PRIN DIVIZIUNE

Reprezentînd forma cea mai răspîndită de multiplicare a bacteriilor, diviziunea directă constă în scindarea celulei-mamă, ajunsă la un punct critic de creştere, în două celule-surori, cel mai adesea absolut identice. La bacteriile cilindrice şi spiralate, diviziunea se face de obicei într-un plan transversal, perpendicular pe axul mare al celulei, şi numai excepţional, la unii spirili, ea se produce longitudinal, într-un plan paralel cu acest ax. Cocii se divid după 1, 2 sau 3 planuri perpendiculare succesive, ceea ce face posibilă gruparea celulelor-surori în cîteva moduri caracteristice. În intervalul de timp dintre două diviziuni, toţi constituenţii celulari, inclusiv ADN, se dublează, cei doi corpi nucleari se separă unul de altul, iar cele două jumătăţi ale celulei-mamă sînt împărţite printr-un sept transversal în două celule noi, care, final, sînt separate unele de altele. Deşi se realizează printr-o serie complexă de evenimente, diviziunea bacteriilor este un proces reglat cu precizie, deoarece celulele nou formate sînt, în general, uniforme ca mărime, iar prezenţa celulelor fără nucleu este foarte rară.

ETAPELE DIVIZIUNII CELULARE

Procesul de diviziune celulară evoluează în cel puţin trei etape principale (Rowbury, 1972):

a) formarea unei membrane, care separă protoplaştii ce vor forma celulele-surori;

b) sinteza peretelui celular pe suprafaţa membranei respective sau formarea unui sept transversal prin creşterea spre interior a peretelui celular periferic, în aşa fel încît celulele care se divid au un înveliş celular complet

(alcătuit din toate structurile parietale componente) la nivelul zonelor care vor deveni una din extremităţile polare ale fiecărei celule;

c) separarea celulelor rezultate.

În cazul unei bacterii cilindrice, teoretic, acest proces se poate realiza pe trei căi (Rowbury, 1972): 1) prin separarea celulei parentale în doi protoplaşti, numai prin intermediul unei membrane sau al unei perechi de membrane (fig. 174 A) ; 2) prin formarea în stadiul iniţial de diviziune a unui sept transversal, alcătuit atît din membrana plasmatică, cît şi din peretele celular periferic (fig. 174 B), urmată de separarea ulterioară sau 3) prin formarea unui sept de membrană, căruia îi urmează creşterea progresivă spre interior a unei invaginări derivate din peretele celular periferic, care va separa progresiv cele două celule, aşa cum se închide diafragma unui obiectiv fotografic (fig. 174 C). În unele cazuri, cele trei procese pot să se asocieze, acţionînd în mod conjugat (fig. 174 D).

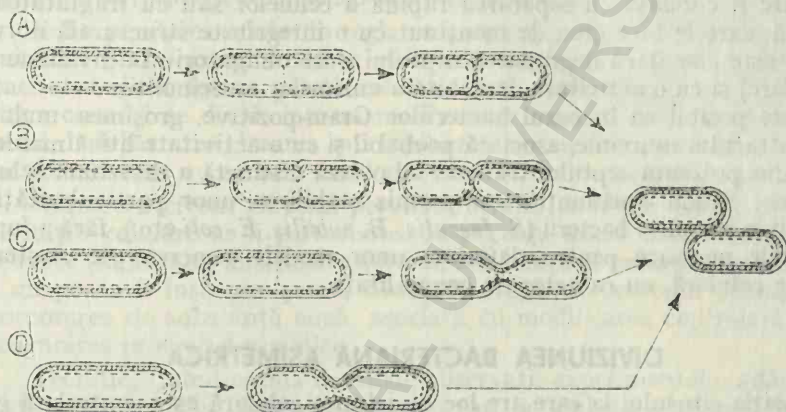


Fig. 174. — Modalităţi posibile ale diviziunii bacteriilor. Membrana plasmatică apare ca o linie întreruptă, iar stratul peptidoglicanic haşurat (după Rowbury, 1972).

La multe bacterii Gram-pozitive, cocoide şi bacilare, etapele diviziunii celulare sînt bine vizibile. În faza iniţială se observă creşterea spre interior a unui sept transversal, format din membrana plasmatică şi peretele celular, evidenţiind net existenţa unor microorganisme divizate în două sau mai multe compartimente (fig. 174 B). Deşi membrana plasmatică poate să crească înaintea peretelui celular, nu se observă nici o etapă în care celula să fie divizată numai de membrana plasmatică.

La bacteriile Gram-negative există controverse asupra modului de diviziune. Mulţi cercetători consideră că evenimentul cel mai important care precede diviziunea acestora este o constricţie (strangulare) a celulei la locul de diviziune, prezentînd o creştere treptată a curburii spre interior şi o îngustare mediană a celulei, care implică atît participarea membranei plasmatice, cît şi a peretelui celular (Slater şi Schaecht, 1974). După Clark (1978), celulele de *E. coli* pe cale de diviziune au substanţa celulară divizată în doi protoplaşti cu cîtva timp înainte de separarea lor, ceea ce sugerează posibilitatea existenţei iniţiale a unui sept de membrană, care obişnuit este distrus prin prelucrarea preparatelor pentru

microscopie electronică. Burdett şi Murray (1974) au pus în evidenţă la *E. coli* (pe preparate fixate după tehnica Ryter-Kellenberger) aspecte de diviziune de tip constrictiv, în care invaginările în formă de V sînt formate din membrana plasmatică, iar stratul mucopeptidic şi membrana externă strîns juxtapuse. În sfîrşit, alte observaţii sugerează că diviziunea prin constricţie ar fi, uneori, dependentă de natura procedeelor de fixare şi/sau de colorare utilizate în microscopia electronică. După datele cele mai noi, bazate pe utilizarea unei game largi de tehnici, diviziunea *E. coli* se face iniţial prin intermediul unui sept transversal format din membrana plasmatică şi stratul mucopeptidic. Membrana externă a peretelui celular participă la formarea septului despărţitor numai tardiv, cînd celulele încep să se separe. Intrarea ei în activitate este marcată de formarea unei vezicule („bleb") sau a unor grupuri de vezicule, la nivelul situsului de diviziune.

Incapacitatea de a demonstra totdeauna prezenţa septurilor transversale poate fi corelată cu separarea rapidă a celulelor sau cu fragilitatea lor deosebită, care le face greu de menţinut cu o integritate structurală normală (deşi nu este clar dacă degradarea septului duce obligatoriu la diviziune prin strangulare) şi cu o activitate deosebită a enzimelor mureinolitice.

Este posibil ca în cazul bacteriilor Gram-pozitive, grosimea mult mai mare a stratului mureinic, asociată probabil şi cu o activitate litică mai lentă, să facă din prezenţa septului transversal o fază distinctă a diviziunii celulelor bacteriene. Studii amănunţite au permis stabilirea unor particularităţi ale diviziunii la anumite bacterii (*S. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* etc.), fără a furniza însă datele necesare pentru definirea unor modele concrete de creştere şi diviziune celulară, cu caracter de generalitate.

DIVIZIUNEA BACTERIANĂ ASIMETRICĂ

Poziţia situsului la care are loc diviziunea celulară este controlată genetic. Ca urmare, în cazul bacteriilor cilindrice, septul de diviziune se formează normal, într-o poziţie ecuatorială, separînd genomurile bacteriene în celule cu mărimi aproximativ egale *(diviziune izomorfă)*. Au fost însă descrise o serie de mutante, la care situsul de diviziune are o localizare anormală.

Cele mai studiate sînt mutantele producătoare de celule miniaturale (minicelule) descrise la *E. coli* şi *B. subtilis* (vezi vol. I, p. 303), care formează celule mici, sferice, la extremităţile unor celule parentale cilindrice, ca rezultat al localizării anormale a situsului de diviziune. Datorită acestui mecanism, cele mai multe minicelule sînt lipsite de ADN şi, ca urmare, sînt incapabile să facă sinteza polimerilor specifici. Minicelulele de *B. subtilis* sînt mobile, ceea ce indică prezenţa unui metabolism energetic funcţional. Ele se formează printr-un mecanism de diviziune structural normal, anomalia fiind legată exclusiv de poziţia septului transversal. Mutantele termosensibile ale *E. coli K 12*, care încetează sinteza ADN la 40° C, după ce cromosomul a fost numai parţial replicat, sînt incapabile să formeze septuri transversale, în aşa fel încît celulele cresc sub forma unor filamente lungi neseptate. Un număr mic din aceste mutante se divid, dar nu formează septuri transversale în regiunea ecuatorială, ca la celulele normale, ci lateral, în aşa fel încît una din celulele rezultate conţine tot materialul genetic al celulei-mamă, iar cealaltă este complet lipsită de ADN. Celula anucleată diferă de minicelule prin faptul că are ~ aceeaşi dimensiune ca şi celula normală, sălbatică.

ROLUL PERETELUI CELULAR BACTERIAN ÎN CREŞTERE ŞI DIVIZIUNE

Peretele celular — în special stratul peptidoglicanic — ca şi membrana plasmatică au un rol esenţial în procesul de creştere şi diviziune, legat de necesitatea de a acoperi un volum celular mărit şi de a asigura separarea celulelor progene. Acest rol a fost demonstrat de acţiunea dozelor mici de penicilină, care, inhibînd sinteza de mucopeptid, blochează diviziunea celulară, respectiv formarea septului transversal, fără să afecteze creşterea (Ingram, 1972). Celulele devin filamente mari, neseptate, în care, aparent, nu se formează nici septurile de membrană plasmatică, deoarece în prezenţa antibioticului filamentele produc un singur sferoplast. Deşi au fost efectuate numeroase studii, modalităţile de creştere şi diviziune, mecanismele care asigură forma şi mărimea celulei, sinteza şi reînnoirea constituenţilor parietali sînt încă incomplet cunoscute (Danco-More şi Shockman, 1977).

Rolul peretelui celular în reglarea creşterii şi diviziunii bacteriene a fost recunoscut şi în urma studiilor efectuate asupra mutantelor defective în capacitatea de a forma perete celular. Deşi unele specii, ca *Mycoplasma*, trăiesc, cresc şi se divid, într-un mod relativ regulat, fără perete celular, în general, îndepărtarea, lezarea sau inhibarea sintezei acestuia duce la apariţia unor forme care nu se mai divid sau care se divid mult mai puţin regulat.

Iniţial s-a crezut că rolul peretelui celular ar fi pur pasiv, în sensul că activităţile celulare ar fi perturbate în absenţa unora dintre caracteristicile sale fizice (rigiditate, menţinerea formei, rezistenţa la variaţii osmotice). Acest rol nu poate fi însă pur pasiv, deoarece creşterea peretelui celular implică încorporarea de substanţă nouă, asociată cu modificarea controlată a formei şi asigurarea protecţiei osmotice.

Teoretic, ţinînd seama de unele observaţii experimentale, adăugarea de constituenţi noi s-ar putea face la una sau la ambele extremităţi, în vecinătatea septului transversal, prin intercalarea constituenţilor noi între cei vechi şi prin întinderea peretelui celular şi depunere de material nou pe suprafaţa internă (fig. 172). Complexitatea diviziunii bacteriilor este demonstrată de numeroasele leziuni genetice distincte, care pot altera comportamentul în acest proces. La *E. coli* au fost descrise mai mult de 10 tipuri de mutante cu diviziunea alterată (Rogers, 1970).

Un rol important revine enzimelor litice care secţionează peretele celular la nivelul situsurilor de creştere, „descoperind" situsurile acceptoare pentru constituenţii parietali noi, creînd spaţiul necesar pentru intercalarea lor şi legarea de mureina preexistentă. Ele participă la iniţierea septului transvers şi în special la clivarea lui finală, care asigură separarea celulelor. Tulpinile de *B. subtilis* deficiente în enzime litice devin filamentoase, sînt septate, dar nu se divid decît dacă li se adaugă lizozim sau autolizine de *B. subtilis*. Deficienţa în lizine nu împiedică septarea, ci numai diviziunea (Fan, 1970). Un rol esenţial în creştere şi diviziune revine prezenţei şi interacţiunii dintre enzimele care sintetizează şi hidrolizează mureina. Este posibil ca tipurile diferite de creştere (difuză, localizată etc.) să fie legate de amplasarea enzimelor care catalizează reacţiile de biosinteză şi de asamblare a constituenţilor parietali, care pot fi localizate în anumite situsuri sau distribuite în membrana plasmatică.

Sinteza peretelui celular în cursul creşterii. Deoarece peretele celular bacterian este situat extracelular, biosinteza constituenţilor săi este un proces vectorial, divizat în trei faze separate (fig. 175).

Faza I-a are loc în citoplasmă, cu participarea enzimelor citoplasmatice şi a substraturilor solubile. La sfîrşitul ei rezultă formarea de UDP-Glc-NAc (uridin-difosfat-N-acetil-D-glucozamină) şi UDP-Mur-NAc-pentapeptid (uridin-difosfat-acid N-acetil muramic).

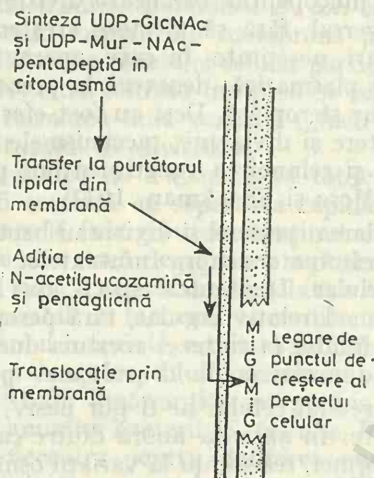


Fig. 175. — Stadiile procesului de biosinteză a peptidoglicanului din peretele celular, în cursul creşterii celulei bacteriene.

Faza a doua are loc la graniţa dintre membrana plasmatică şi citoplasmă şi duce la formarea unei subunităţi complete de peptidoglican. Procesul este iniţiat prin transferul fosfo-Mur-NAc-pentapeptidului la un purtător lipidic de membrană (undecaprenilfosfat, bactoprenol, lipid *P*), fosfolipid, specializat în ancorarea intermediarilor peptidoglicanici de membrană. În această fază are loc completarea structurii dizaharidului parietal prin adiţia de Glc-NAc şi a cinci resturi de glicină (—Y Y Y Y Y—).

Faza a treia — intraparietală — este iniţiată prin translocarea subunităţii complete legată de lipid, prin membrană, pe suprafaţa externă a acesteia, unde va fi folosită ca bloc de construcţie pentru alungirea lanţului peptidoglicanic preexistent. Modificările acestei structuri polimerice născînde prin transpeptidare, transglicozilare şi hidroliză, care duc la formarea unei structuri parietale mature, sînt implicate în modulările structurii, necesare pentru creşterea şi diviziunea celulară.

Koch (1981), precum şi Koch, Higgins şi Doyle (1982) au propus un model general de creştere a peretelui celular la bacterii, în acord cu care acesta se măreşte în cursul creşterii, în special în regiuni limitate cu peptidoglican rezistent la stress avînd localizări diferite la organisme cu forme diferite. În aceste regiuni, unităţile oligomere de peptidoglican sînt adăugate structurii existente, fără să afecteze rezistenţa originară. Aceste noi adiţii nu sînt iniţial sub tensiunea determinată de stressul hidrostatic, suportat de peretele celular vechi, dar după ce au fost legate covalent de perete, în mai multe situsuri, are loc clivarea specifică a peretelui preexistent, în aşa fel încît porţiunile nou inserate nu mai sînt menţinute lax, ci devin structural importante, intrînd sub ten-

siune, într-o configurație extinsă, care forțează celula să-și mărească suprafața peretelui celular și să devină rezistentă la stressul presiunii.

În cazul cocilor aproape sferici (*Staphylococcus*, *Neisseria*), creșterea peretelui celular determină formarea *de novo* a unui sept plan, ecuatorial, de-a lungul unui diametru al celulei (fig. 176). Pe măsură ce volumul celulei crește,

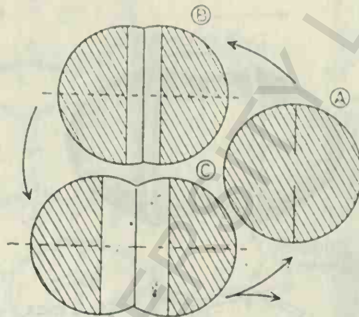


Fig. 176. — Modelul idealizat de creștere difuză a peretelui celular la bacteriile sferice din genul *Staphylococus*. A. Celulă sferică, nou produsă prin diviziune. B. Septul transversal a fost completat și parțial clivat. C. Procesul continuă; zonele neumbrite reprezintă regiuni cu perete celular nou format. În acest model, peretele nou este adăugat peste întreaga zonă a polilor celulari noi, menținînd forma sferică, după separarea celulelor-surori (după Koch, Higgins și Doyle, 1982).

septul se clivează progresiv, iar părțile recent separate bombează, devenind convexe, formînd două emisfere. În felul acesta, peretele nou format (anterior septal) devine o parte a suprafeței sferei, în continuitatea polului vechi al celulei: se formează două celule sferice, avînd dimensiunile inițiale.

Spre deosebire de bacteriile sferice Gram-pozitive, care au în mod evident zone de creștere cu poziția ecuatorială ce asigură atît formarea septului transversal, cît și alungirea peretelui celular (Daneo-Moore și Shockman, 1977), situația bacteriilor cilindrice Gram-pozitive este mai puțin clară. Unele ar crește prin intercalarea difuză a mureinei nou sintetizate în perete (Archibald și Coapes, 1976), iar altele ar prezenta o creștere zonală (Burdett și Higgins, 1978). La bacteriile Gram-negative, materialul nou sintetizat ar fi inserat în peretele celular vechi printr-un proces de intercalare difuză, într-un număr foarte mare de situsuri, repartizate uniform pe toată suprafața celulei bacteriene, cu excepția calotelor polare (Cole, 1965).

CREȘTEREA ȘI DIVIZIUNEA LA STREPTOCOCCUS FAECALIS

Procesul de creștere și diviziune a fost cel mai mult studiat cu ajutorul tehnicilor de autoradiografie (Briles și Tomasz, 1970), imunofluorescență (Wagner, 1964), și electronografie (Higgins și Shockman, 1971, 1976), la *S. faecalis*, care reprezintă un model experimental ideal. Între altele, această bacterie are avantajul de a poseda, în toate fazele ciclului de diviziune, un marker de suprafață, de jur-împrejurul celulei, sub forma unei benzi ecuatoriale, ușor proeminentă, ca un inel, situată la distanțe egale de polii celulei (fig. 177). Această bandă ecuatorială marchează locul de întîlnire a suprafețelor peretelui celular, produse în cursul a două generații diferite de celule, respectiv „întîlnirea” dintre calotele polare care s-au format în ciclul celular precedent, cu peretele celular sintetizat în ciclul celular cel mai recent, localizat ecuatorial.

În plus, spre deosebire de alte bacterii, septul transversal apare foarte precoce în raport cu ciclul de diviziune și este evident (Shockman și Higgins, 1971), iar procesul de reînnoire (turnover) a peptidoglicanului nu are un nivel detectabil, în nici o fază de creștere. Ca urmare, grosimea peretelui celular reflectă rezultatul încorporării cumulate a precursorilor și nu produsul unui echilibru între asamblare și reînnoire.

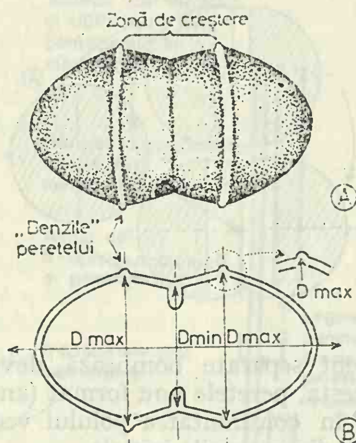


Fig. 177. — A. Reprezentarea diagramatică a unei celule de *Streptococcus faecalis*, evidențiind „zona de creștere", cuprinsă între două benzi parietale, formată din perete celular „nou", asamblat exclusiv în ciclul de creștere. B. Secțiune longitudinală axială a celulei din A. D max — diametrul maxim; D min — diametrul minim (după Higgins și Shockman, 1976).

Pe baza unui număr foarte mare de secțiuni centrale și a reconstituirii modificărilor ultrastructurale ale procesului de creștere a peretelui celular și a septului transversal, Higgins și Shockman (1970, 1976) au demonstrat că *S. faecalis* își mărește suprafața prin inserția ecuatorială a unor zone de perete celular „nou", în mijlocul celui „vechi". Fiecare „zonă de creștere" se dezvoltă centripet, determinînd, în ultimă instanță, formarea progresivă a unui perete transversal complet și scindarea lui pentru a forma regiunile polare complete ale celulelor rezultate. Acest proces este facilitat de faptul că precursorii peretelui celular sînt depuși de-a lungul „marginii de înaintare" („leading edge") a septului care crește, în așa fel încît formează un perete celular dublu stratificat, ce poate fi scindat ușor în două straturi de perete periferic. Utilizînd o tehnică originală de reconstrucție tridimensională a zonelor de creștere, prin rotația matematică în jurul unui ax central a diferitelor măsurători efectuate pe secțiunile ultrafine, centrale și longitudinale ale celulei, Higgins și Shockman (1976) au reconstituit geometria asamblării peretelui celular la *S. faecalis* și parametrii diferitelor structuri, care caracterizează ciclul de creștere a învelișului celular la această bacterie.

Fig. 178 ilustrează modul de dezvoltare a regiunii septale și creșterea peretelui periferic pe secțiuni și în reconstituire tridimensională, pînă cînd septul transversal este complet închis și separat sub forma celor doi poli celulari noi. Cînd procesul de creștere diminuă, presiunea hidrostatică internă face ca polul periferic să devină progresiv mai curbat și să stimuleze diviziunea celulară.

După ultimul model al lui Higgins și Shockman (1976), precursorii parietali sînt vehiculați în zona de creștere pe două canale (A și B din fig. 179). Canalul A este implicat în asamblarea septului transversal, în timp ce precurso-

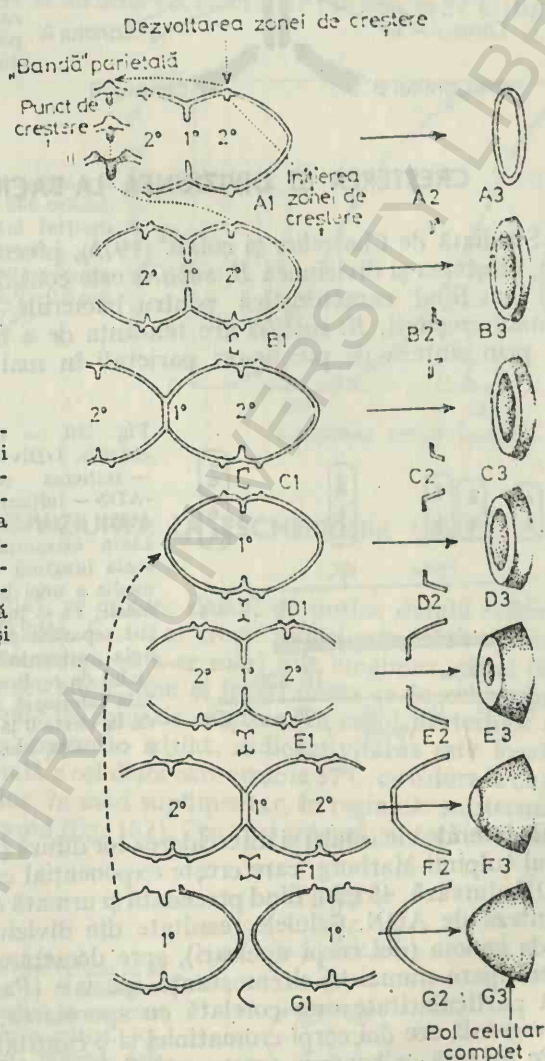


Fig. 178. — Fazele procesului de creștere a peretelui celular și de formare a septului transversal care asigură diviziunea și separarea celulelor-surori la *S. faecalis* pe secțiune transversală (stînga) și reprezentarea lor tridimensională (dreapta) (după Higgins și Shockman, 1976).

rii transportați prin canalul B asigură o grosime constantă a septului transvers la baza sa, înainte de septare și apoi sînt intercalați în el, mărind grosimea peretelui transversal, pe măsură ce acesta este scindat în cele două straturi ale peretelui periferic. După asamblare, peptidoglicanul este modificat prin „funcția remodelatoare" a enzimelor autolitice bacteriene.

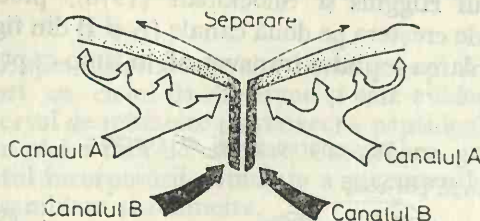


Fig. 179. — Modelul lui Higgins şi Shockman (1976) de formare şi separare a peretelui celular la *S. faecalis*, evidenţiind fluxul precursorilor parietali pe două canale (A şi B), în zona de creştere.

CREŞTEREA ŞI DIVIZIUNEA LA BACILLUS SUBTILIS

Studiată de Chastelier şi colab. (1975), precum şi de Burdert şi Higgins (1978), creşterea şi diviziunea *B. subtilis* este considerată de Nanninga şi colab. (1979) ca fiind caracteristică pentru bacteriile cilindrice, Gram-pozitive. În cursul creşterii, *B. subtilis* are tendinţa de a forma celule mai lungi (fig. 180), prin sinteza de precursori parietali în mai multe puncte situate în

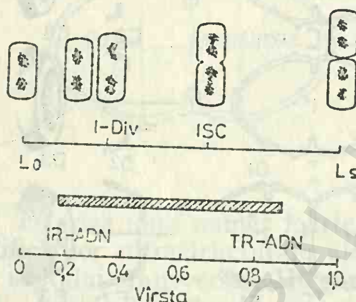


Fig. 180. — Ciclul celular la *Bacillus subtilis*. I-Div—iniţierea diviziunii; I SC — iniţierea separării celulare; IR-ADN— iniţierea replicării ADN; TR-ADN — terminarea replicării ADN. Linia orizontală superioară reprezintă scala lungimii lineare, Lo — lungimea medie a unei bacterii în momentul formării; Ls — lungimea medie în momentul separării (nu al diviziunii celulare), linia orizontală haşurată reprezintă ciclul de replicare al ADN; linia orizontală inferioară reprezintă scala timpului de la vîrsta 0 la vîrsta 1 (65 de minute) a celulelor bacteriene (după Nanninga, 1979).

regiunile laterale ale celulei şi intercalarea lor difuză (spre deosebire de *E. coli*). În cazul tulpinii Marburg, care creşte exponenţial cu DG = 65 min, replicarea ADN durează 45 min, fiind precedată şi urmată de o perioadă de ~ 10 min fără sinteză de ADN. Celulele rezultate din diviziunea precedentă au două seturi de genom (doi corpi nucleari), spre deosebire de *E. coli*, la care acest fenomen apare numai în circumstanţe speciale (Paulton, 1971). Probabil că această particularitate este corelată cu sporularea, care începe numai cînd celula vegetală are doi corpi cromatinici şi o cantitate dublă de ADN faţă de spor. Pe măsură ce bacteria creşte, corpii nucleari se alungesc, iau forma de halteră şi fiecare este clivat în două structuri compacte. Cînd celulele au atins o anumită dimensiune critică începe diviziunea celulară, care precede cu mult terminarea sintezei de ADN.

Replicarea ADN şi segregarea ADN merg „mînă în mînă", în aşa fel încît segregarea celor 4 corpi nucleari rezultaţi este terminată la puţin timp după terminarea replicării ADN. Separarea celor două celule începe după 45 min, înainte ca septul transvers să fie terminat şi durează ~ 22 minute. Frecvent,

celulele rezultate rămîn reunite în lanţuri. La sfîrşitul procesului de diviziune, fiecare celulă rezultată conţine două genomuri în acelaşi compartiment celular. Segregarea lor în celule diferite are loc 65 min mai tîrziu (după un nou timp de dedublare), respectiv la un interval efectiv de 130 min, la 37°C (fig. 181).

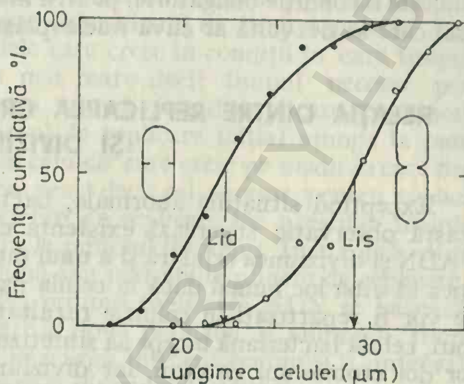


Fig. 181. — Diviziunea şi separarea celulelor (frecvenţe obţinute pe 606 celule). Lungimea medie în momentul iniţierii diviziunii (Lid) este de 2,2 ± 0,3 μm, iar în momentul în care începe separarea celulelor-surori (Lis) este de 2,9±0,3 μm (după Nanninga. 1979).

CREŞTEREA ŞI DIVIZIUNEA LA ESCHERICHIA COLI

Deşi relativ mult studiat, se cunosc destul de puţine detalii referitoare la acest proces. După Marr (1966), *E. coli* ar creşte numai prin mărirea lungimii celulei, dar Grover (1977) consideră că s-ar mări atît lungimea, cît şi diametrul celulei. Sinteza de perete celular nou şi intercalarea sa în cel vechi s-ar face la nivelul unui număr mic de zone de creştere. În cazul bacteriilor cultivate pe medii cu acid diaminopimelic tritiat, radioactivitatea este localizată preferenţial în zona ecuatorială a celulelor care cresc la 37°C, cu o durată de generaţie de 50—80 min şi, în plus, în mod suplimentar, în regiunile subterminale, la bacteriile care cresc mai rapid (fig. 182). Cea mai intensă sinteză de mureină

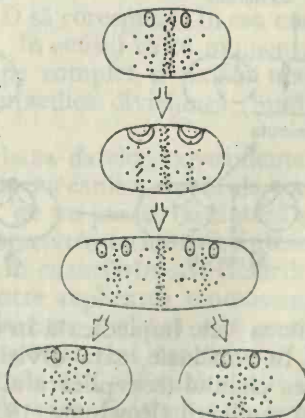


Fig. 182. — Creşterea peretelui celular la *E. coli*, evidenţiind zonele de radioactivitate (punctate) cînd mediul de cultură conţine acid diaminopimelic tritiat. Radioactivitatea cea mai intensă este localizată în regiunea de formare a septului transversal. Zonele cu radioactivitate mai slabă corespund probabil regiunilor în care are loc alungirea celulei. Structurile sferice şi emisferice corespund nucleilor (după Schwartz şi colab., 1975).

are loc în regiunea septului transversal. Fosfolipidele şi proteinele membranare sînt fie introduse într-un număr mare de situsuri, fie numai în cîteva, de unde sînt dispersate rapid (Green şi Schaechter, 1972). Diviziunea *E. coli* începe, după unii autori, cu constricţia celulei („strangulare") şi este însoţită de separarea concomitentă a celulelor rezultate. Terminarea replicării ADN anterior diviziunii este o condiţie obligatorie, pentru motive topologice. Altfel, septul transversal care se dezvoltă ar cliva nucleoplasma localizată central.

RELAŢIA DINTRE REPLICAREA CROMOSOMULUI BACTERIAN ŞI DIVIZIUNE

Exceptînd situaţiile anormale, bacteriile fără nucleu apar foarte rar. Această observaţie sugerează existenţa unei legături obligatorii între replicarea ADN şi diviziunea celulară şi a unui mecanism de control, care face ca diviziunea să aibă loc numai dacă în celula parentală există disponibili doi nuclei, care vor fi repartizaţi în celulele rezultate din diviziune. În cele mai multe cazuri, celula bacteriană începe să sintetizeze septul transversal după separarea celor doi cromosomi progeni, iar diviziunea are loc după terminarea rundei de replicare a ADN, la un interval de timp fix, necesar pentru exprimarea mai multor reacţii speciale, implicate în creşterea membranei, sinteza de material de perete celular şi formarea septului transvers. Experimental s-a demonstrat că diviziunea celulară este obligatoriu dependentă de existenţa unui sistem funcţional de sinteză a ADN, care asigură diviziunea exclusiv a acelor celule în care ADN a fost replicat şi care sînt capabile să producă, după separare, două celule-surori normale (fig. 183).

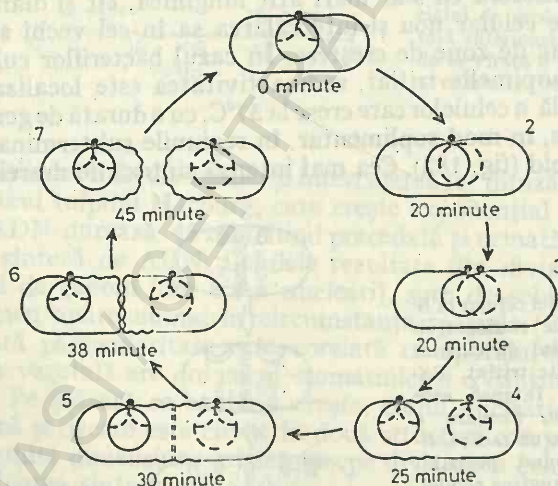


Fig. 183. — Reprezentarea schematică a ciclului de diviziune la *E. coli* şi relaţia acesteia cu replicarea cromosomului (după Phaff, 1981).

Diviziunea este împiedicată în cazurile în care ar urma să rezulte celule fără nuclei. În concluzie, rata diviziunii celulare la bacterii este guvernată de terminarea ciclului de replicare al ADN şi prin acesta, indirect, de timpul de iniţiere al replicării (Rowbury, 1972).

Rolul inițierii replicării cromosomale. Replicarea cromosomului bacterian începe cu inițierea sintezei ADN la nivelul unui situs unic — „replicatorul" cromosomal. Ea necesită sinteza de proteine și depinde, probabil, de atingerea unui raport critic între masa celulară și ADN. Inițierea replicării cromosomale are loc în momentul în care s-a acumulat o cantitate fixă de proteină „inițiator". Ca urmare, rata diviziunii celulare este determinată de timpul necesar pentru acumularea „inițiatorului". La celulele care cresc în condiții în care timpul de formare a proteinei „inițiator" este mai mare decît timpul necesar pentru replicarea integrală a unui cromosom, un nou ciclu de replicare cromosomală nu este inițiat decît după ce punctul de replicare inițial ajunge la punctul terminus al cromosomului. Invers, în celulele care cresc pe medii în care timpul dintre două inițieri succesive este mai scurt decît cel necesar pentru replicarea cromosomului, vor fi inițiate noi cicluri de replicare ale acestuia înainte ca ciclul replicării anterioare să fi ajuns la punctul terminus. În această situație, celulele vor conține cromosomi cu două sau mai multe puncte de replicare.

Modelul lui Helmstetter (1979) privind replicarea ADN se bazează pe constanța la toate ratele de creștere a două perioade, și anume a timpului necesar unui punct de replicare să parcurgă întregul genom și a intervalului dintre sfîrșitul unei runde de replicare și diviziunea celulară.

Rolul terminării replicării cromosomale. Diviziunea este în mod cert dependentă de sfîrșitul replicării cromosomului. Perioada dintre terminarea unei runde de replicare și diviziune (perioada D) este de ~ 20—25 min, la 37°C.

Terminarea replicării ar putea iniția procesul de diviziune pe mai multe căi:

a) în cursul replicării , genele de diviziune ar fi menținute în poziția „stop" de un represor, care este neutralizat sau a cărui sinteză încetează în momentul în care are loc replicarea ultimei gene, situată la punctul terminus al cromosomului (Rogers, 1970);

b) terminarea replicării ar putea duce la eliberarea unui component unic, de diviziune, de tipul lizinelor de diviziune (Schwarz, Asmus și Frank, 1969);

c) proteinele de diviziune ar fi sintetizate permanent, dar inițierea asamblării lor într-un sept de creștere transversal s-ar face numai în perioada D;

d) există posibilitatea ca perioada D să corespundă în cea mai mare parte unei faze de separare fizică a celulelor, în sensul că în momentul terminării ciclului de replicare septul ar fi aproape complet și numai unele obstacole fizice ale nucleilor încă neseparați ar împiedica diviziunea (Smith și Pardee, 1970).

În concluzie, se poate afirma, pe baza datelor experimentale existente, că, probabil, toate bacteriile dispun de un mecanism dublu de control al ratei de diviziune, reprezentat, pe de o parte, de un proces de sinteză și acumulare a unei proteine „inițiator" și pe de alta de nevoia terminării sintezei ADN, care împiedică formarea de celule fără nucleu, în cazurile în care ciclurile de replicare nu s-au încheiat. Relația temporală dintre replicarea cromosomului și diviziune este perfect reglată. Mutantele la care reglarea este perturbată prin interferență cu formarea septului transversal sînt condiționat letale (cresc normal la 30°C și încetează să se dezvolte la 41°C). Există și alte dovezi suplimentare, ca, de exemplu, unele mutante la care diviziunea nucleară încetează, dar creșterea și alungirea celulei, ca și formarea de septuri continuă o perioadă

de timp, avînd ca rezultat formarea de celule anucleate (fără ADN), incapabile de creştere. De asemenea, au fost izolate mutante la care diviziunea nucleară continuă fără formare de septuri transversale, ceea ce duce la formarea unui filament bacterian foarte lung, multinucleat.

Factorii care controlează rata sintezei ADN în celula bacteriană. Deoarece conţinutul în ADN per unitate de masă celulară rămîne constant în cursul unor rate largi de creştere, este evident că viteza sintezei ADN este strîns corelată (creşte sau descreşte paralel) cu rata de creştere a celulei bacteriene. Teoretic, acest proces s-ar putea realiza prin două mecanisme: 1) prin variaţia vitezei de circulaţie a ADN-replicazei în jurul cromosomului circular, corelată cu rata de creştere, ceea ce ar duce la iniţierea unor cicluri noi de replicare, înainte ca unul anterior să se încheie şi 2) viteza de circulaţie a replicazei fiind constantă, rata de sinteză a ADN ar fi controlată de numărul de copii cromosomale, care sînt sintetizate simultan.

Experimental s-a demonstrat că, la bacterii, de obicei acţionează cel de-al doilea mecanism, timpul de circulaţie normal al replicazei la *E. coli* B/r fiind de 40 min la 37°C (Rowbury, 1972). Fig. 184 prezintă aspectul cromosomilor bacterieni la 0 ; 20 ; 30 ; 40 şi 60 min, în cazul unor celule care cresc cu un timp de generaţie (T) mediu de 60 min (a), de 40 min (b) şi 20 min (c). Cînd rata de creştere se măreşte, se formează mai mult ADN, deoarece la fiecare T minute (timp de generaţie) încep noi cicluri de replicare ale ADN. Astfel, cînd celulele cresc rapid (T = 20 min), la fiecare 20 min începe un nou ciclu de replicare, înainte ca acel anterior să se fi terminat. De aceea apar cromosomi cu „furci de replicare" multiple (fig. 184 c). Cînd timpul de generaţie este de 40 min (egal cu viteza de replicare a cromosomului), un nou ciclu de replicare începe simultan cu sfîrşitul celui anterior (fig. 184). În sfîrşit, cînd rata de creştere este

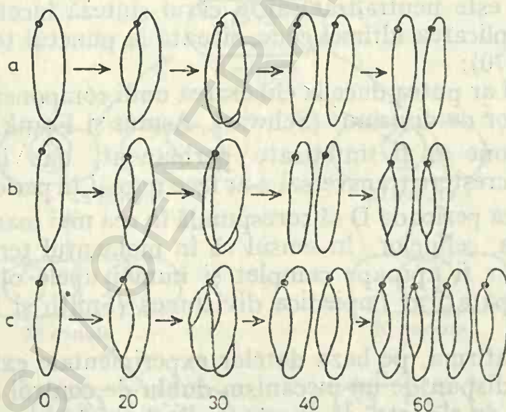


Fig. 184. — Replicarea ADN bacterian la diferite rate de creştere. Sînt reprezentate configuraţiile cromosomilor la 0; 20; 30; 40 şi 60 de minute, pentru celulele care cresc cu timpul de generaţie mediu de 60 de minute (a), 40 de minute (b) şi 20 de minute (c). Pentru simplificare s-a presupus că replicarea este unidirecţională şi nu a început la timpul zero.

lentă (T = 60 min), un nou ciclu de replicare începe la fiecare 60 min. Deoarece, ciclul de replicare a ADN durează 40 min, există o perioadă în desfăşurarea ciclului celular , lipsită de sinteză de ADN, cuprinsă între sfîrşitul unui ciclu de replicare şi începutul celui următor (Rowbury, 1972).

Numeroase observaţii experimentale sugerează existenţa unui control de acest gen, ceea ce demonstrează că rata sintezei ADN este controlată de frecvenţa cu care încep ciclurile de replicare, iniţierea replicării fiind mai frecventă la bacteriile care cresc şi se divid mai rapid.

Segregarea nucleilor la bacterii. Relaţia obligatorie dintre sinteza de ADN şi diviziunea celulară asigură ca diviziunea să aibă loc numai în momentul în care cromosomii nou formaţi sînt disponibili pentru segregare, în aşa fel încît fiecare din cele două celule-surori rezultate sînt înzestrate cu o copie exactă a genomului celulei parentale. Spre deosebire de celulele eucariote, la care separarea materialului nuclear se realizează graţie aparatului mitotic complex ce asigură migrarea lui polară în cursul anafazei, la bacterii, segregarea este asigurată de legarea stabilă a genomului, în tot cursul ciclului de replicare, de anumite puncte specifice ale membranei plasmatice, fie direct, fie mai ales prin intermediul mezosomilor. Ca urmare, atît echipartiţia, cît şi separarea propriu-zisă rezultă din biosinteza de membrană plasmatică nouă (Jacob, Ryter şi Cuzin, 1966).

Legătura dintre cromosomi şi mezosomi este deosebit de puternică, aşa cum o arată faptul că în cursul plasmolizei mezosomul, progresiv devaginat sub acţiunea forţelor osmotice, trage după el cromosomul, care ajunge astfel să fie direct alipit de membrana plasmatică. În plus, s-a demonstrat experimental că după liza menajată a protoplaştilor, porţiunea din ADN cromosomal care se replică activ, rămîne legată de protoplast sau de unele resturi de membrană. De asemenea, la *E. coli* a fost descrisă o ADN-replicază legată de membrana plasmatică (Knippers, 1970).

La bacteriile Gram-pozitive, examinarea celulelor care se divid, pe secţiuni în serie, a arătat legătura directă dintre mezosomi şi cromosomi, precum şi faptul că în momentul diviziunii, mezosomii se dublează şi se deplasează lateral spre regiunile polare ale celulei, fiecare avînd cîte un cromosom ataşat de el. Creşterea membranei în spaţiul dintre cei doi nuclei nou formaţi asigură segregarea şi separarea lor, prin formarea septului transversal. Tratarea cu un marker — teluritul de K — care se depune selectiv în formă redusă la situsurile de oxidoreducere ale membranei, sub formă de cristale vizibile la microscopul electronic, demonstrează sinteza nouă de membrană plasmatică în regiunea de legare a cromosomului.

La bacteriile Gram-negative, la care mezosomii sînt foarte slab dezvoltaţi, cromosomii bacterieni sînt legaţi fie la baza lor, fie direct de membrana plasmatică.

Donachie şi Begg (1970) au elaborat un model care explică modul în care poate avea loc creşterea preferenţială a membranei plasmatice între nucleosomi la *E. coli* (fig. 185). După acest model, iniţial, nucleul ar fi legat aproape de una din extremităţile celulei, dar, datorită faptului că bacteria creşte unidirecţional, printr-un punct de creştere al membranei situat la nivelul punctului de legare a cromosomului, sau foarte aproape de acesta, nucleul ajunge la sfîrşitul perioadei de creştere central (ecuatorial). Deoarece, septul de diviziune se formează echidistant faţă de cei doi nuclei pe cale de separare, este probabil că situsul de care se leagă constituenţii septului transversal este situat fie la nivelul punctului de legare a cromosomului pe membrană, fie foarte aproape de el. Cum cele două puncte de creştere ale membranei separă corpii nucleari, septul transversal este „lăsat între ele" (Donachie şi Begg, 1970). Unitatea de segregare la bacterii este reprezentată, prin urmare, de membrana plasmatică sau de formaţiunile derivate din ea — mezosomii — de care sînt fixaţi repliconii celulari. Pentru ca replicarea ADN să fie coordonată cu diviziunea

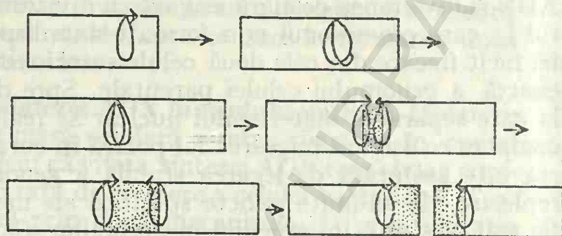


Fig. 185. — Creşterea membranei şi segregarea cromosomilor după diviziune la *E. coli*. Cromosomul legat iniţial de suprafaţa celulei, aproape de una din extremităţile bacteriei, devine situat ecuatorial în urma creşterii acesteia. Săgeţile indică direcţia de creştere a membranei celulare. Membrana nou formată între cei doi cromosomi care segregă este reprezentată prin regiunea punctată (după Donachie şi Begg, 1970).

celulară, este necesar ca la nivelul zonei de fixare a repliconilor să acţioneze semnale care pot opri sau declanşa replicarea. În felul acesta, reproducerea materialului genetic este corelată cu creşterea celulară, prin intermediul semnalelor chimice transmise de membrana plasmatică în curs de creştere la sistemul enzimatic de reglare a replicării de la nivelul genomului.

DINAMICA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR ÎN CULTURI

În general, microorganismele sînt cultivate pentru mai multe scopuri, ca de exemplu: 1) izolarea şi identificarea lor; 2) menţinerea în stare viabilă, în colecţii, fără pierderea funcţiilor importante; 3) studiul structurii şi funcţiei lor; 4) studierea rolului în natură; 5) obţinerea de produşi rezultaţi din biomasa celulară, biosinteză, fermentaţii, bioconversii etc. În prezent se cunosc relativ puţine date în legătură cu dinamica multiplicării populaţiilor bacteriene în natură. Procesul este însă destul de bine cunoscut raportat la multiplicarea în condiţii experimentale — de laborator — sau industriale.

Există două tipuri principale de culturi bacteriene: *culturile discontinue* (în mediu de cultură nereînnoit), care se pot realiza în două variante (*asincrone şi sincronizate*), şi *culturile continue*, în mediu de cultură reînnoit continuu.

CULTURILE DISCONTINUE ASINCRONE

Aceste culturi corespund cultivării în ,,sisteme închise'', în care un anumit volum de mediu corespunzător este ,,însămînţat'' cu bacteriile respective (,,Batch-culture'', engl. batch=şarjă, lot). În aceste condiţii, creşterea este limitată la un volum fix de mediu, care nu este reînnoit şi care de multe ori este modificat de acumularea produşilor de metabolism, putînd deveni la un moment dat necorespunzător pentru creştere. Acest gen de cultivare este folosit curent în laborator, deşi are o serie de dezavantaje de care trebuie ţinut seama: numărul bacteriilor variază continuu, ritmul de creştere este impus de compoziţia chimică a mediului, care variază de la un moment la altul, vîrsta bacteriilor individuale este variabilă, numărul de generaţii posibile este limitat.

Pentru a aprecia dinamica multiplicării, la intervale regulate se recoltează probe mici de cultură, care sînt analizate, iar valorile logaritmice ale numărului de celule sînt înscrise pe curbe ale căror modificări arată tranziţia

de la o fază de creştere la alta. În general, se folosesc logaritmi în baza 2, deoarece fiecare unitate pe ordonată reprezintă o dublare a populaţiei bacteriene respective. În aceste condiţii, procesul evoluează în şase faze succesive, în funcţie de rata de creştere (notată cu r sau μ): faza de lag, faza de accelerare, faza de creştere exponenţială, faza de încetinire, faza staţionară şi faza de declin (fig. 186).

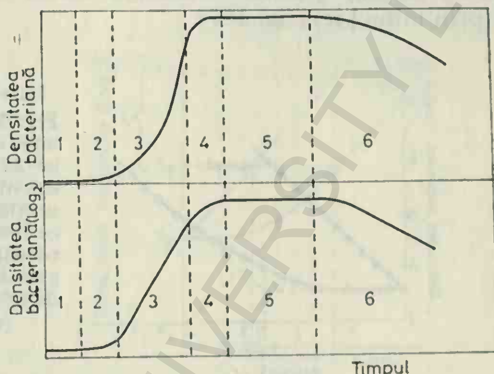


Fig. 186. — Curbele de creştere a unei populaţii bacteriene, în culturi discontinue, în coordonate obişnuite (sus) şi semilogaritmice (jos). 1. Faza de lag. 2. Faza de accelerare. 3. Faza logaritmică sau exponenţială. 4. Faza de încetinire. 5. Faza staţionară. 6. Faza de declin (după Senez, 1968).

Faza de lag (engl. to lag = a întîrzia), numită şi de *latenţă* sau de *creştere zero* ($\mu = 0$), este cuprinsă între momentul introducerii celulelor în mediu („însămînţare") şi momentul cînd ele încep să se multiplice. În cursul acestei faze, numărul bacteriilor din inoculum rămîne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic.

Durata latenţei (timpul de lag, Tl) exprimă întîrzierea creşterii reale faţă de creşterea „ideală", care se observă în absenţa latenţei.

Faza de latenţă, ca şi **faza de accelerare a ritmului de creştere** ($\mu \nearrow$) sînt facultative, apariţia lor fiind determinată de *vîrsta culturii* şi de *necesitatea adaptării enzimatice*. În cazul culturilor „bătrîne", care au încetat de mult creşterea, aceste două faze apar ca nişte faze de reîntinerire, de adaptare la condiţiile noi de cultivare. Bacteriile viabile din inoculum, care reprezintă adesea un procent relativ mic, îşi refac stocul de structuri (ribosomi), sisteme enzimatice şi metaboliţi esenţiali necesari creşterii, în cazul în care aceşti constituenţi le lipseau sau erau deficitari din cauza condiţiilor de viaţă anterioare însămînţării. Numeroase dovezi experimentale pledează pentru această interpretare:

— Durata fazei de lag poate fi redusă la limite imperceptibile în cazurile în care se foloseşte un inoculum mare de cultură în faza logaritmică, iar transplantarea se face într-un mediu de cultură bogat, identic cu cel în care au fost cultivate bacteriile din inoculum.

— Perioada de lag este prelungită în cazul transferului unor celule cultivate dintr-un mediu bogat într-un mediu sărac, deoarece celulele trebuie să-şi formeze întregul set de enzime necesar pentru sinteza tuturor metaboliţilor esenţiali.

— Perioada de lag este, de asemenea, evidentă chiar dacă se inoculează celule în faza exponenţială, în cazurile în care transferul se face într-un mediu care conţine o sursă diferită de carbon sau azot. În aceste cazuri, celulele

nu au iniţial concentraţia ridicată de enzime necesară pentru utilizarea unui nutrient nou şi este nevoie de o perioadă de timp pentru ca enzimele inductibile să ajungă nivelul celular necesar pentru a asigura creşterea cu o rată maximă. Spre exemplu, celulele de *E. coli* provenite dintr-o cultură exponenţială, pe un mediu cu arabinoză, continuă să crească exponenţial după transferul într-un mediu cu glucoză, pentru metabolismul căreia au în mod normal enzimele necesare, dar prezintă un lag de 2,5 ore la 37°C, după transferul pe un mediu cu xiloză, pentru utilizarea căreia enzimele trebuie sintetizate *de novo* (prin inducţie) (fig. 187).

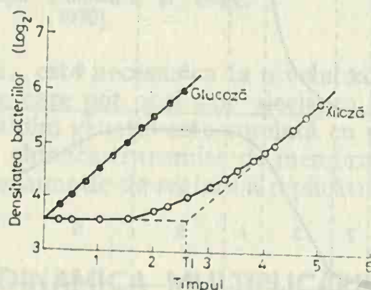


Fig. 187. — Relaţia dintre adaptarea enzimatică şi faza de latenţă la *E. coli* cultivată pe medii sintetice. Bacteriile în faza exponenţială a unei culturi pe mediu cu arabinoză cresc imediat după transferul într-un mediu cu glucoză şi numai după o latenţă de 2,5 ore pe un mediu cu xiloză (după Monod, 1949).

— Perioada de lag este necesară pentru celulele lezate (dar încă viabile) de efectul unor agenţi fizici (căldură, radiaţii) sau toxice chimice, datorită timpului necesar pentru reparaţie.

— În unele cazuri, perioada de lag poate fi datorită unui fenomen de „selecţie a unei populaţii mutante" şi are o durată în mod deosebit de lungă. Situaţia este întîlnită cînd bacteriile din inoculum formează două populaţii genetic diferite de celule, şi anume, cînd populaţia majoritară este incapabilă să utilizeze sursele de C şi N din mediul nou, spre deosebire de cîteva celule mutante care au această capacitate. În aceste situaţii, majoritatea celulelor nemutante mor, iar masa celulară începe să crească numai în momentul în care rarele celule mutante din populaţia respectivă s-au multiplicat suficient pentru a forma o fracţiune semnificativă din acea populaţie. De fapt, în acest caz, perioada de lag este numai aparentă (nu reală), deoarece rarele celule mutante capabile să crească în condiţiile respective încep să se multiplice exponenţial cu mult înainte ca prezenţa lor să fie evidentă, prin creşterea turbidităţii mediului de cultură.

În cursul fazei de lag, celulele individuale cresc foarte mult ca mărime, au un conţinut mărit în proteine, ARN şi fosfor. De asemenea, activitatea metabolică şi sensibilitatea la agenţi fizici şi chimici sînt mărite.

Măsurarea fazei de lag. Faza de lag sau timpul de latenţă (Tl) reprezintă, în fond, o perioadă de întîrziere observată în creşterea reală a unei populaţii bacteriene faţă de creşterea „ideală", adică faţă de creşterea care ar fi fost observată în absenţa latenţei (Lodge şi Hinshelwood, 1942). Ca urmare, durata fazei de lag se poate determina grafic, comparînd curba de creştere observată a populaţiei bacteriene studiate cu curba de creştere „ideală", în care creşterea s-ar face fără lag (fig. 188). Practic, Tl se determină: a) măsurînd pe curbe semilogaritmice intervalul de timp între faza exponenţială observată şi

dreapta paralelă care trece prin originea sa sau b) se poate exprima cantitativ, determinînd grafic diferența dintre numărul de diviziuni din creșterea reală și cea ideală (Monod, 1945).

Faza de multiplicare exponențială (caracteristică organismelor unicelulare) sau de *creștere logaritmică* este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce

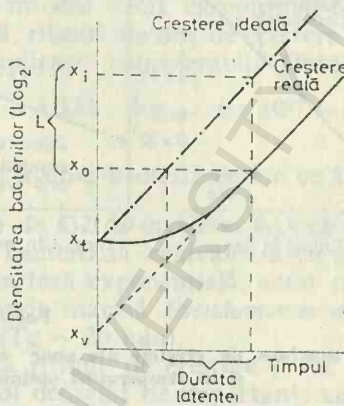


Fig. 188 — Determinarea grafică a latenței. x_t — inoculum total; x_v — fracțiunea viabilă din inoculum; x_0 — populația obținută după un timp dat; x_i — populația obținută în același interval de timp într-o creștere „ideală" (fără latență); L — diferența numărului de diviziuni între creșterea ideală și creșterea reală (după Senez, 1968).

cu o viteză progresiv mărită, acest ritm devine constant și maxim ($\mu = max$) pentru un microorganism dat, în anumite condiții de cultură. Creșterea exponențială este consecința faptului că după ce o celulă se divide pentru a forma două celule-surori, fiecare, la rîndul său, se divide și produce alte două celule noi, în așa fel încît, în momentul fiecărei diviziuni, populația se dublează. În cursul acestei faze, care în coordonate semilogaritmice se exprimă grafic printr-o linie dreaptă, mortalitatea celulară este practic nulă, în așa fel încît masa celulară și numărul celulelor cresc paralel.

Bacteriile aflate în faza logaritmică au o citoplasmă omogenă, nu conțin materiale de rezervă și au o mare afinitate pentru coloranții bazici, datorită conținutului lor ridicat în ARN. Mărimea lor este constantă, depășind însă dimensiunile caracteristice speciei.

Timpul de generație. Rata creșterii exponențiale se apreciază, în general, prin *timpul de generație* sau *timpul de dublare*, care reprezintă intervalul de timp necesar pentru dublarea prin diviziune a unei celule individuale și respectiv timpul necesar pentru dublarea unei populații bacteriene. Practic, poate fi exprimat prin intervalul de timp dintre două diviziuni *(durata unei generații* măsurată în minute sau ore) sau prin numărul de generații pe oră.

Modul cel mai simplu de a determina timpul de generație al unei populații bacteriene care crește exponențial constă într-o înregistrare grafică a logaritmului numărului de celule, față de timp, care permite citirea directă, pe grafic, a timpului necesar pentru dublarea populației respective (fig. 189). Durata timpului de generație în condiții de cultură optime, în faza exponențială, este minimă și reprezintă o proprietate controlată genetic, fapt care explică diferențele mari de la o specie la alta (tabelul nr. 38). Supusă acestei

limite superioare determinată genetic, rata de creştere efectivă a unei anumite bacterii este influenţată de factorii de mediu ca, natura şi concentraţia nutrienţilor, temperatura, pH etc.

Una dintre caracteristicile fazei exponenţiale este că rata de creştere a numărului de celule este la început lentă, pentru ca ulterior, în etapele tar-

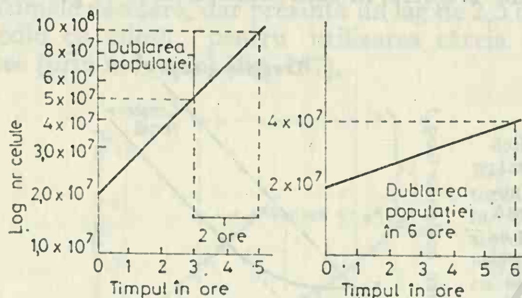


Fig. 189. — Aprecierea timpului de generaţie în cazul unei populaţii bacteriene care creşte exponenţial.

Tabelul nr. 38

Vitezele maxime de creştere ale unor microorganisme în medii de cultură bogate şi la temperaturi optime (după date din literatură)

	Tg(minute)	γ max		Tg(minute)	γ max
Bacillus megaterium	9	6,6	*Lactobacillus* sp.	100	0,6
Pseudomonas natriegens	9,8	6,1	*Rhizobium meliloti*	108	0,55
E. coli—Aerogenes	20	3	*Rhodospirillum rubrum*	300	0,2
Salmonella—Proteus	20—30	3—2	*Chlorella pyrenoidosa*	510	0,11
Staphylococcus—Streptococcus	25—30	2,4—1,7	*Paramecium* sp.	630	0,09
Pseudomonas sp.	30—40	2—1,5	*Anabaena cylindrica*	1 440	0,041
Corynebacterium sp.	35—40	1,7—1,5	*Amoeba proteus*	1 440	0,041
Clostridium sp.	40—80	1,5—0,7	*Mycobacterium tuberculosis*	1 620	0,037
Saccharomyces cerevisiae	60—120	1—0,5	*Treponema palidum*	1 980	0,004

Tg = timpul mediu de diviziune celulară.
γ_{max} = rata maximă de creştere exponenţială (număr de diviziuni pe oră).

dive, să devină explozivă. Una din aplicaţiile practice a acestei evoluţii este legată de posibilitatea păstrării unui produs nesteril o perioadă limitată de timp, chiar în condiţii favorabile creşterii microorganismelor, care devin dăunătoare numai după ce numărul de celule creşte masiv. Deşi foarte carac-

teristică pentru bacterii, capacitatea de creștere exponențială se manifestă ca atare, numai o scurtă perioadă de timp, deoarece după un timp relativ scurt, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv. Creșterea indivizilor din populația bacteriană se face asincron, datorită faptului că în aceste condiții de încetinire a ritmului de creștere devin manifeste unele mici diferențe individuale în ceea ce privește timpul de diviziune celulară.

Potențialul de creștere exponențială a bacteriilor. În timp ce în culturile realizate în laborator creșterea se menține în fază exponențială un număr limitat de diviziuni, în natură condițiile nu sînt decît excepțional favorabile acestui ritm de multiplicare. Teoretic însă, ritmul maxim de creștere al bacteriilor corespunde unui potențial de multiplicare considerabil. Ținînd seama de ecuația de creștere $\left(n = \log_2 \frac{Xt}{X0} = 3{,}322\ (\log_{10}\ 6\times10^{27} - \log_{10} 5\times10^{-13})\right)$, pornind de la o celulă unică, a unei bacterii sferice cu Ø de 1 μm și greutatea de 5×10^{-13}g, după un număr de 132 de diviziuni (*n*) exponențiale, s-ar ajunge, teoretic, la o masă celulară bacteriană echivalentă cu greutatea planetei Terra (6×10^{27}g) (Senez, 1968). În fază exponențială, acest număr de diviziuni ar fi atins în 22 de ore de bacteria marină *Pseudomonas natriegens* (Tg ~ 9,8 min) și în 44 de ore de *E. coli* (Tg ~ 20 min).

Printre parametrii care influențează ritmul de creștere și fac ca acest potențial să nu se poată realiza au un rol deosebit de important: concentrația unui factor limitant, acumularea unor produși de catabolism sau toxici și variațiile de temperatură. Ca urmare, ritmul de creștere a bacteriilor este discontinuu, astfel că în condiții normale de cultură, în medii lichide, bacteriile aerobe uzuale ajung numai pînă la densitatea de 2×10^8 celule/ml, iar în culturi aerate și agitate continuu pînă la aceea de $\sim 5\times10^9$ celule/ml ($\sim$ 1 g substanță uscată la litru). Deși nu se realizează indefinit, potențialul exponențial de multiplicare a bacteriilor explică supraviețuirea lor în natură, deseori în condiții defavorabile de mediu.

Faza de încetinire corespunde perioadei în care concentrația „factorului limitant" al creșterii scade sub nivelul care asigură creșterea maximă sau este pe cale de a fi epuizat. Sub denumirea de „factor limitant" se înțelege orice factor a cărui lipsă din mediu oprește creșterea. El poate fi reprezentat de un nutrient esențial (sursă de C, N, energie) sau un factor de creștere (în cazul microorganismelor auxotrofe) etc. În unele cazuri, rolul de factor limitant poate fi reprezentat de o modificare fizică sau fizicochimică a mediului, sub acțiunea produșilor de metabolism. În această fază, pe măsură ce factorul limitant este consumat, creșterea ia toate valorile intermediare între creșterea cu o rată maximă și 0. Posibilitatea de a controla și dirija rata creșterii sub acțiunea concentrației factorului limitant este utilizată în practică în dispozitivele de cultivare continuă în chemostat.

Faza staționară urmează perioadei de încetinire a ritmului de creștere, în care multiplicarea nu se mai produce în progresie geometrică, ci într-un ritm care scade progresiv. Explicația este că într-o cultură în care nutrienții nu sînt reînnoiți, creșterea exponențială se realizează numai cîteva generații, după care rata de creștere scade progresiv pînă cînd încetează complet, ca o consecință a acumulării de produși toxici de metabolism sau a epuizării unui nutrient.

Cultura intră în faza staţionară (rata de creştere $\mu = 0$), care durează mai multe ore şi în cursul căreia numărul celulelor viabile este maxim şi rămîne constant o perioadă de timp, a cărei durată este variabilă în funcţie de sensibilitatea bacteriilor la condiţii defavorabile de mediu.

Caracterul şi durata fazei staţionare sînt variabile în funcţie de natura factorilor care limitează creşterea. În cazurile în care faza staţionară este determinată de epuizarea unui nutrient esenţial (sursă de energie, de N sau C), celulele încetează să se mai multiplice: numărul total al indivizilor populaţiei rămîne constant şi o perioadă de timp egal cu numărul celulelor viabile. Ca urmare, numărul total al celulelor, numărul celulelor viabile şi masa celulară devin toate staţionare aproximativ în acelaşi moment şi pot rămîne neschimbate ca mărime mai multe ore. Atunci cînd este vorba de o lipsă parţială de substanţe nutritive sau de acumularea unor produşi toxici, tranziţia la faza staţionară este mai puţin evidentă. Apreciind după numărul celulelor viabile populaţia poate ajunge în faza staţionară, dar multiplicarea persistă în ritm încetinit şi este contrabalansată de o mortalitate cu ritm echivalent. Numărul celulelor viabile rămîne constant, în timp ce numărul total al celulelor (atît vii, cît şi moarte), ca şi masa celulară prezintă o creştere lentă. În aceste circumstanţe, faza staţionară este un fenomen statistic, determinat de faptul că creşterea numerică a unor membri ai populaţiei este contrabalansată de moartea altora. Moartea celulelor poate fi, în unele cazuri, însoţită de liză (fig. 190).

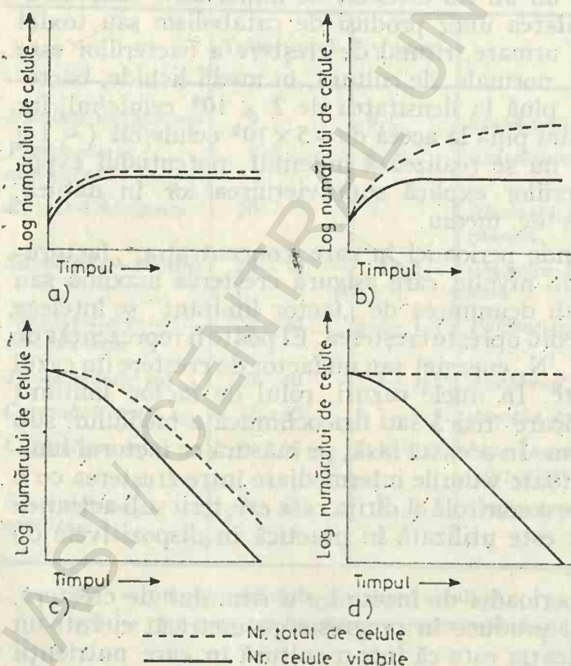


Fig. 190 — Relaţia dintre numărul celulelor viabile şi numărul total de celule în faza staţionară maximă şi faza de declin şi moartea celulelor. a. Creşterea limitată prin epuizarea completă a sursei de energie. b. Creşterea limitată prin acumularea de produşi toxici sau epuizarea parţială a nutrienţilor. c. Moartea celulelor, însoţită de liză rapidă. d. Moarte fără autoliza celulelor (după Stanier, 1976).

În cursul fazei staţionare, celulele bacteriene sînt considerate ,,mature", avînd morfologia descrisă drept caracteristică pentru fiecare specie: dimensiuni mai mici decît în faza de creştere exponenţială, citoplasma mai puţin omogenă,

datorită apariției de incluziuni și acumulării unor substanțe de rezervă, afinitate moderată, „normală" pentru coloranți și prezența sporilor la speciile sporogene. Oprirea creșterii antrenează o profundă remaniere structurală și biochimică și în special un turnover rapid al proteinelor și ARN (Mandelstam, 1960). În timp ce în faza de creștere exponențială proteinele și ARN (atît ARNr, cît și ARNt) sînt menținute în limite stabile, în momentul opririi creșterii ele sînt supuse unui turnover de 5—7% pe oră. Degradarea proteinelor și a ARN este efectuată de enzime care preexistă în timpul creșterii exponențiale, dar sînt probabil inactive, rămînînd legate la nivelul ribosomilor. Fragmentarea polisomilor și modificarea concentrației de Mg^{2+} joacă probabil un rol important în activitatea lor. Faptul că în faza staționară proteinele și ARN sînt constant degradate și resintetizate, fără ca masa lor totală să varieze mult, prezintă importanță practică pentru biosinteza indusă a enzimelor în celulele neproliferante.

Faza de declin și moarte celulară. După un interval de timp $\pm$ îndelungat, în funcție de natura microorganismelor și de condițiile de cultură, începe faza de declin a populației respective, în cursul căreia populația bacteriană descrește numeric ($\mu = 0$). În faza inițială, mai precoce și mai rapidă, se înregistrează o diminuare a numărului celulelor viabile, ca rezultat al morții unui număr de celule, după care scade și densitatea culturii, în urma proceselor de autoliză produse de enzimele proteolitice endogene.

Moartea celulelor bacteriene este accelerată în prezența unui substrat energetic, ceea ce demonstrează că funcționarea enzimelor metabolismului celular mărește labilitatea bacteriilor în perioada de declin. Ea este întîrziată de Mg^{2+} (care își exercită efectul protector inhibînd activitatea ribonucleazei, fapt care sugerează că pierderea viabilității s-ar datora, în primul rînd, alterării ARN și a ribosomilor) și de concentrația mare a bacteriilor în mediu („efectul de populație").

Creșterea lineară a bacteriilor. Uneori, cinetica multiplicării bacteriilor devine aritmetică, respectiv densitatea populației crește în funcție directă de timp. Acest mod de multiplicare reflectă un dezechilibru profund, determinat de limitarea în O_2 sau, mai ales, de incapacitatea de a sintetiza un metabolit sau una sau mai multe enzime esențiale. În acest ultim caz, puterea catalitică totală a populației bacteriene nu poate să mai crească în continuare și, ca urmare, creșterea continuă, utilizînd enzimele preexistente. La fiecare dublare succesivă a populației, puterea catalitică a celulelor individuale și deci potențialul lor de creștere sînt aproximativ înjumătățite. Ca urmare, creșterea este limitată și devine direct poporțională cu timpul, adică aritmetică (lineară). Un exemplu caracteristic este furnizat de bacteriile care au nevoie pentru a se dezvolta de un factor de creștere, ca, de exemplu, acid nicotinic, precursor biosintetic al piridinnucleotidelor. Ca rezultat al rolului piridinnucleotidelor în respirația celulară (în transportul de electroni), nivelul acidului nicotinic în celulă determină rata globală a metabolismului și deci a creșterii. Cînd nu mai este sintetizat, rata de creștere a populației devine direct proporțională cu cantitatea de piridinnucleotide din celulă.

Creșterea diauxică. Descrisă de J. Monod (1942), diauxia a fost considerată inițial ca un fenomen limitat, bazat pe proprietatea glucozei de a inhiba biosinteza indusă a β-galactozidazei. Ea se manifestă atunci cînd

E. coli este cultivată într-un mediu care conţine, în acelaşi timp, glucoză şi lactoză, determinînd apariţia unei curbe de creştere cu caracter particular, formată din două faze de creştere exponenţială, separate de o perioadă tranzitorie de lag, de ~ 4 ore (fig. 191). Analiza mediului de cultură demonstrează

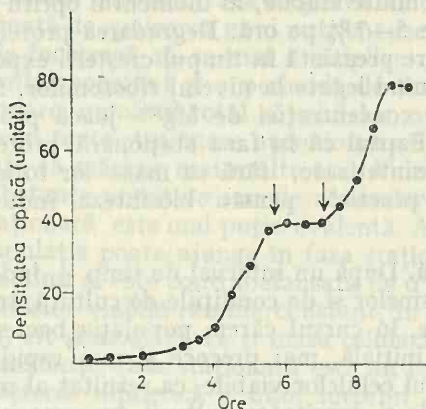


Fig. 191. — Creşterea diauxică a *B. subtilis* pe mediu cu glucoză şi arabinoză. Glucoza este utilizată în prima perioadă de creştere şi arabinoza în cea de-a doua. Încetarea temporară a creşterii după ~ 5 ore (marcată între două săgeţi) reflectă utilizarea completă a glucozei şi corespunde perioadei în care are loc sinteza enzimelor necesare pentru utilizarea arabinozei (după Monod, 1958).

că sfîrşitul primei faze de creştere exponenţială coincide cu epuizarea completă a glucozei şi că lactoza este metabolizată exclusiv în cursul celei de-a doua faze de creştere. Creşterea totală a *E. coli*, în aceste condiţii, reprezintă, practic, suma creşterilor parţiale, care ar fi fost obţinute, dacă aceleaşi concentraţii ale fiecăruia dintre cele două zaharuri ar fi fost folosite separat. Fenomenul a fost explicat prin faptul că glucoza reprimă sinteza β-galactozidazei şi, ca urmare, utilizarea lactozei este condiţionată de epuizarea prealabilă completă a glucozei, după care creşterea este reluată pe seama lactozei. Numită şi „efectul glucozei" — deoarece aceasta a fost prima substanţă identificată care îl poate iniţia — diauxia a fost observată ori de cîte ori *E. coli* a fost cultivată în medii care conţin un amestec de glucoză şi un zahar utilizabil cu ajutorul enzimelor inductibile (glucoză — galactoză, glucoză — xiloză). Ea nu apare cînd mediul conţine un amestec de glucoză cu fructoză sau manoză, zaharuri metabolizate de enzime „constituţionale".

Ulterior, s-a demonstrat că „efectul glucozei", respectiv represia sintezei enzimelor inductibile sub acţiunea glucozei, este un fenomen mai general, în sensul că nu este limitat la *E. coli* şi că se întîlneşte şi în cazul altor substraturi decît cele semnalate. După descrierea fenomenului de „represie prin catabolit"*) de către Magasanik (1960), s-a demonstrat că diauxia este în realitate o consecinţă a acestui mecanism. Ea apare ori de cîte ori mediul de cultură conţine în acelaşi timp două surse de energie, dacă una dintre ele este supusă represiei prin catabolit. β-galactozidaza este o enzimă inductibilă, dar sinteza ei este supusă şi represiei prin catabolit. Ca urmare, atît timp cît glucoza este prezentă în mediu, *E. coli* utilizează acest zahar şi sinteza de β-galactozidază este represată. Cînd glucoza este epuizată, represia prin catabolit este anulată, începe

*) Fenomenul va fi prezentat pe larg în vol. III.

sinteza de β-galactozidază (în cursul fazei intermediare de lag, fig. 191) și creșterea este reluată prin utilizarea lactozei.

Explicația diauxiei rezidă în faptul că, atunci cînd bacteriile utilizează o sursă de energie metabolizabilă rapid rezultă o creștere marcată de ATP intracelular. Acumularea de ATP determină o scădere a concentrației de AMP ciclic sub limita care în mod normal activează sinteza multor enzime catabolice și, odată cu aceasta, represia sintezei β-galactozidazei sau a altor compuși supuși acestui gen de control.

FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ CREȘTEREA MICROORGANISMELOR

Creșterea bacteriilor, ca și a altor microorganisme este influențată, în afară de compoziția chimică a mediului, de numeroși factori de mediu, ca, de exemplu, temperatura, pH, condițiile osmotice, prezența sau absența O_2, lumină, presiunea hidrostatică, prezența unor substanțe stimulatoare sau inhibitoare etc.*) Modificările extreme ale celor mai mulți din acești factori pot produce, pe lîngă modificări morfologice anormale, perturbări metabolice, scăderea ratei de creștere și în ultimă instanță blocarea ei completă.

INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI DE NUTRIENȚI ASUPRA CREȘTERII MICROORGANISMELOR

Ca regulă generală, rata creșterii unui microorganism este neafectată de concentrația nutrienților atît timp cît aceștia nu ajung la valori foarte scăzute. În schimb, scăderea concentrației lor sub o anumită limită afectează rata de creștere și/ sau creșterea totală ca biomasă a microorganismelor. Astfel, rata de creștere, studiată experimental la *E. coli*, în funcție de concentrația glucozei, este riguros proporțională la concentrații mici de nutrienți și crește pe măsură ce concentrația acestora este mărită, pînă la o valoare maximă, la care concentrația nutrienților ajunge la un nivel inhibitor, cînd rata creșterii scade din nou (fig. 192).

Același tip de curbă hiperbolică exprimînd relația dintre cei doi parametri se obține cu o mutantă auxotrofă de *E. coli*, în prezența unei concentrații variabile de triptofan. Figura 193 care prezintă relația dintre concentrația nutrienților, rata de creștere și creșterea maximă de biomasă demonstrează că în concentrații foarte mici nutrienții influențează atît rata de creștere, cît și creșterea totală. La concentrații moderate și mari (2,0 mg/1 — 8,0 mg/1), ratele de creștere sînt identice, dar creșterea totală este afectată. Dincolo de o anumită limită însă, creșterea concentrației nutrienților poate continua, fără ca să mărească corespunzător masa celulară, deoarece alt nutrient sau factor de mediu devine limitant pentru o creștere în continuare a biomasei.

Efectul concentrației de nutrienți asupra creșterii totale (biomasei) microbiene este ușor de înțeles, deoarece cea mai mare parte a lor sînt convertiți în mate-

---

*) Prezentarea lor *in extenso* se va face în vol. IV.

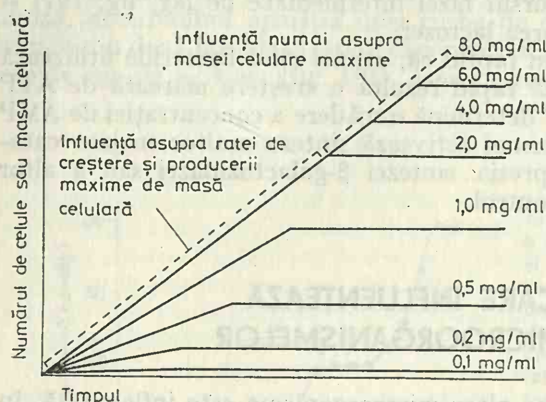


Fig. 192. — Relaţia dintre diferite concentraţii de nutrienţi, rata creşterii şi producerea maximă de biomasă bacteriană.

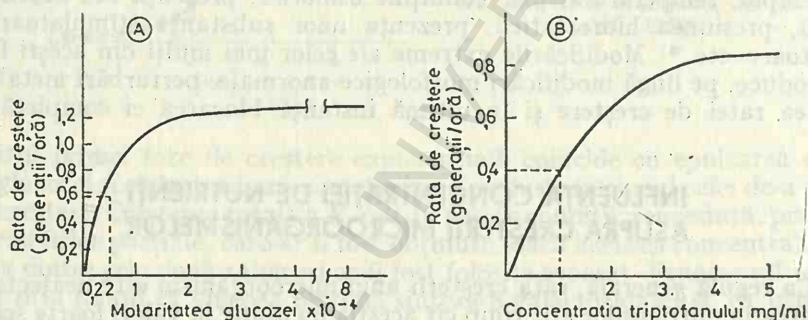


Fig. 193. — Efectul concentraţiei nutrienţilor asupra creşterii la *E. coli*. A. Efectul concentraţiei glucozei. B. Efectul concentraţiei triptofanului (pentru o mutantă dependentă de triptofan). În ambele scheme, linia întreruptă verticală arată concentraţia nutrientului care permite creşterea la jumătate din rata maximală; aceste concentraţii sînt de $0,22 \times 10^{-4}$ M pentru glucoză şi de 1,1 mg/ml pentru triptofan (după Stanier, 1976).

rial celular. Ca urmare, în mediile sărace în substanţe nutritive, creşterea în masă celulară este limitată. Mai greu de explicat este influenţa concentraţiei joase a nutrienţilor asupra ratei de creştere. Este posibil ca acest efect să fie determinat de afinitatea permeazelor specifice faţă de nutrienţi şi de faptul că la concentraţii joase ei nu pot fi transportaţi în celulă suficient de rapid, pentru a satisface nevoile celulare, deoarece nu toate proteinele de transport sînt ocupate în acest proces. În favoarea acestei explicaţii pledează observaţia că, bacteriile mutante care nu sintetizează o anumită permează şi sînt dependente de pătrunderea nutrientului corespunzător numai prin difuzie pasivă nu cresc la fel cu cele normale, chiar dacă concentraţia nutrientului în mediu este de o mie de ori mai mare. Posibilitatea modificării ratei de creştere prin variaţia concentraţiei nutrienţilor este utilizată în practică în culturile continue în chemostat.

CREŞTEREA ECHILIBRATĂ ŞI NEECHILIBRATĂ

În cursul fazei experimentale de creştere într-un mediu adecvat, bacteriile sînt într-o stare de creştere echilibrată („balanced growth"), deoarece creşterea masei celulare este însoţită de o creştere proporţională a diferiţilor compuşi celulari (ADN, ARN, proteine etc.) (fig. 194 A). Ca urmare, bacte-

riile își mențin o compoziție chimică constantă. În această fază, activitatea metabolică dominantă este sinteza proteinelor. Aproximativ 4/5—9/10 din carbonul asimilat și din energia consumată sînt implicate direct în acest proces.

Influența nutrienților asupra ratei de creștere și asupra sintezei de ADN, ARN și proteine a fost studiată la *E. coli* prin transferul într-un mediu de

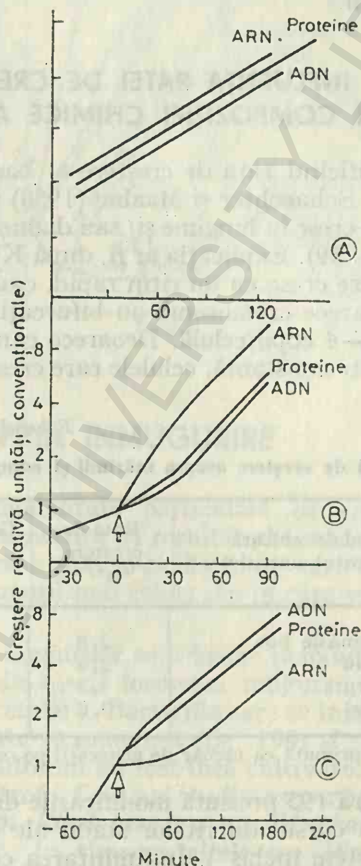


Fig. 194. — Modificările conținutului în ARN, ADN și proteine la *E. coli*, în cursul creșterii echilibrate, exponențiale și după transferul în medii de cultură modificate. **A.** Conținutul celulelor în faza de creștere echilibrată pe un mediu cu glucoză și săruri minerale. **B.** După transferul în bulion nutritiv (transfer „step-up"). **C.** După transferul celulelor cultivate în bulion în mediul mai sărac cu glucoză—săruri minerale (transfer „step-down"). Săgețile indică momentul transferului.

cultură modificat. Astfel, transferul dintr-un mediu simplu (săruri minerale—glucoză) în bulion nutritiv, în care creșterea se poate face mai rapid decît anterior („Shift-up" sau „step-up transfer"), are drept urmare creșterea imediată a ratei de sinteză a ARN, urmată, ceva mai tîrziu, de creșterea sintezei de ADN și de proteine și după un interval ceva mai lung de creșterea ratei de diviziune (fig. 194 B). În perioada imediat următoare transferului în mediul mai bogat, creșterea a devenit neechilibrată, datorită condițiilor de mediu modificate, deoarece diferiți constituenți esențiali nu erau sintetizați cu aceeași rată. Dacă se face transferul invers, din mediul bogat (bulion nutritiv) în mediul sărac (glucoză—săruri) (transferul „step-down"), rata sintezei ARN descrește imediat, pentru a fi reluată într-un ritm mai lent după 1,5—2,0 ore de la transfer, în timp ce sinteza de ADN și de proteine, ca și diviziunea celulară continuă cu rata anterioară, mai rapidă, pentru a descrește ulterior, stabilindu-se o rată nouă, care face ca fiecare celulă să conțină un singur cromosom (fig. 194 C).

Modificările rapide ale ratei de sinteză a ARN sugerează că aceasta ar putea fi factorul esenţial în reglarea ratei de creştere. Întrucît cea mai mare parte din ARN este ARN ribosomal este evident că în condiţii favorabile, iniţial, creşte rata sintezei ribosomilor, în timp ce creşterea sintezei proteinelor este întîrziată, deoarece este condiţionată de prezenţa unui număr crescut de ribosomi.

INFLUENŢA RATEI DE CREŞTERE ASUPRA MĂRIMII ŞI COMPOZIŢIEI CHIMICE A CELULELOR BACTERIENE

Modificînd rata de creştere a bacteriilor prin variaţia diferitelor surse de C şi N, Schaechter şi Maaløe (1958) au demonstrat că dimensiunile celulei bacteriene cresc în lungime şi/ sau diametru paralel cu mărirea ratei de creştere (tabelul nr. 39). Explicaţia ar fi, după Kjeldgaard (1966), legată de faptul că în celulele care cresc cu un ritm rapid, cantitatea de ADN este mărită semnificativ, deoarece cromosomii au bifurcaţii de replicare multiple sau pot fi prezenţi în 2—4 copii/celulă. Deoarece cantitatea de ADN per unitate de masă celulară este constantă, celulele care cresc rapid trebuie să fie mai mari.

Tabelul nr. 39

Efectul ratei de creştere asupra mărimii şi compoziţiei celulelor de Salmonella typhimurium

Mediul de cultură (substratul nutritiv)	Rata de creştere μ*)	Greutatea uscată per celulă g× 10^{-15}	„Nuclei" per celulă	ARN per nucleu g× 10^{-15}
Bulion — inimă de bou	2,8	1090	2,9	84
Bulion simplu	2,4	840	2,4	65
Glucoză—săruri	1,2	360	1,5	31
Lizină—săruri	0,6	240	1,1	22

*) Exprimată ca număr de generaţii pe oră.

Figura 195 prezintă modificările dimensiunilor celulare şi ale compoziţiei chimice în cursul diferitelor stadii ale creşterii bacteriilor în culturi discontinue („sistem închis"). Însămînţarea celulelor bacteriene din faza de repaus într-un mediu proaspăt, bogat în nutrienţi, este urmată imediat de creşterea logaritmică a greutăţii celulare şi de creşterea netă a ARN/celulă, pînă la timpul *a*↑. Perioada cuprinsă între momentul inoculării şi timpul *a*↑ reprezintă perioada de lag, respectiv timpul necesar fiecărei celule individuale pentru ca să înceapă să se dividă. Începînd de la timpul *a*↑, masa celulară/ml şi numărul celulelor/ml cresc logaritmic, în timp ce greutatea celulelor individuale şi valorile ARN rămîn relativ constante. La timpul *b*↓, cînd un anumit nutrient din mediu este epuizat, greutatea celulelor individuale scade, ca şi conţinutul ARN/celulă. Diviziunea celulară continuă exponenţial pînă la timpul *c*↑, pentru ca apoi ritmul să descrească pînă la timpul *d*↑, cînd cultura trece în faza staţionară. Cantitatea de ADN este mică, în comparaţie cu aceea a ARN, variind numai în raport cu rata de creştere, deoarece celulele care se divid rapid au 2 sau chiar 4 „nuclei", în timp ce cele din faza staţionară sau de declin au un singur „nucleu".

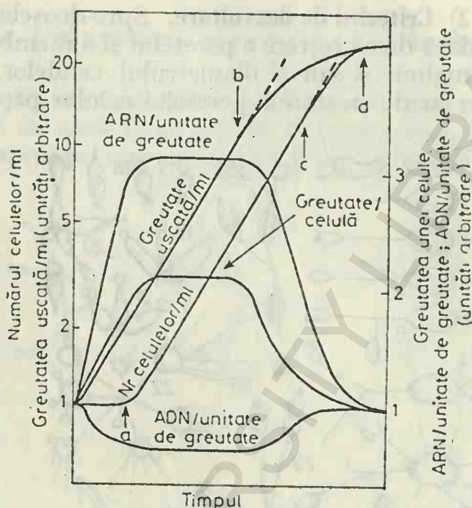


Fig. 195. — Reprezentarea schematică a modificării mărimii celulare și a compoziției chimice în cursul creșterii bacteriilor în culturi discontinue (după Hersert, 1961).

MULTIPLICAREA PRIN ÎNMUGURIRE

„Înmugurirea" reprezintă o modalitate particulară de reproducere, constînd în separarea a două celule asimetrice ca rezultat al formării de către celula-mamă a unei protuberanțe locale, mai mică decît ea, care creează un spațiu nou, în care vor migra constituenții noii celule sau în care vor fi sintetizați *de novo* (Grove, 1973).

Formarea de structuri similare mugurilor este foarte răspîndită la bacterii, dar numai un număr limitat de specii formează muguri „adevărați" *în mod regulat*, înainte de diviziunea celulară. Bacteriile care se înmulțesc prin înmugurire prezintă o mare diversitate taxonomică (fig. 196) și sînt relativ puțin cunoscute, deoarece cele mai multe nu au fost încă cultivate. Ele pot fi foto- sau chemotrofe, auto- sau heterotrofe. Cele mai studiate aparțin genurilor de bacterii prostecate: *Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Hyphomicrobium, Ancalomicrobium, Prosthecobacter* etc., în timp ce altele ca: *Planctomyces, Metallogenium, Nitrobacter winogradskii, Pasteuria, Seliberia carboxyhidrogena* etc. sînt lipsite de această structură. Formarea unei celule noi de către o bacterie poate fi considerată ca un proces adevărat de înmugurire dacă se îndeplinesc trei criterii:

1) **Criteriul morfologic.** Celula nouă trebuie să fie inițial mult mai mică decît celula-mamă și să rămînă temporar ca atare și după separare. În diviziunea transversală directă (binară), celula-mamă se divide în două celule-surori, în timp ce ea dispare. Ca urmare, nici una dintre cele două celule-surori nu poate fi considerată ca originară (parentală). În înmugurire, celula-mamă formează o celulă-fiică, mai mică, fiecare păstrîndu-și identitatea de-a lungul generațiilor. În multe cazuri, ele pot fi deosebite morfologic, ca, de exemplu, la *Pasteuria* sensu Staley, la care mugurele este mobil, avînd un flagel, în timp ce celula-mamă este imobilă și sesilă.

2) **Criteriul de dezvoltare.** Spre deosebire de diviziunea directă, care este precedată de o creştere a peretelui şi a membranei plasmatice, ce asigură mărirea lungimii şi/sau a diametrului celulelor, înmugurirea reprezintă un caz particular de creştere a peretelui celular parental, prin slăbirea lui localizată,

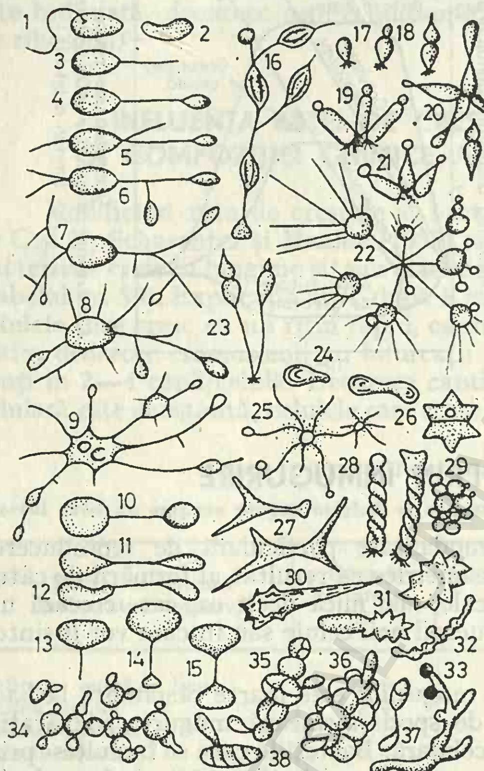


Fig. 196. — Tipurile morfologice de bacterii care înmuguresc (după Hirsch, 1974): 1—7. *Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Rhodomicrobium, Hyphomonas*. 8—9. *Pedomicrobium*. 10. *Hyphomicrobium, Hyphomonas, Rhodomicrobium, Pedomicrobium*. 11—12. *Hyphomicrobium, Pedomicrobium*. 13—15. Bacterii în formă de ciupercă. 16. *Rhodomicrobium*. 17—18. *Pasteuria*. 19, 21. *Blastobacter, Methylosinus*. 20. *Planctomyces, Guttaeformis*. 22. *Planctomyces bekefii*. 23. *Planctomyces* sp. 24. *Rhodopseudomonas*. 25. *Metallogenium*. 26. Bacterii în formă de stea. 27. *Ancalomicrobium*. 28. *Seliberia*. 29. *Planctomyces ferrimorula, Methanococcus*. 30. *Ancalochloris*. 31. *Prosthecomicrobium, Prosthecochloris*. 32. *Mycoplasma, Acholeplasma, Thermoplasma*. 33. *Micromonospora*. 34. *Mycococcus*. 35—38. *Geodermatophilus, Blastococcus*. Reprezentarea grafică nu este efectuată în raport cu dimensiunile reale.

urmată de creştere numai într-o zonă foarte limitată. Trăsătura cea mai caracteristică a înmuguririi decurge din faptul că învelişurile celulare sînt integral sintetizate *de novo*, în aşa fel încît, virtual, nici un constituent parietal, parental nu este încorporat în mugure (fig. 197). Acest fenomen este foarte evident

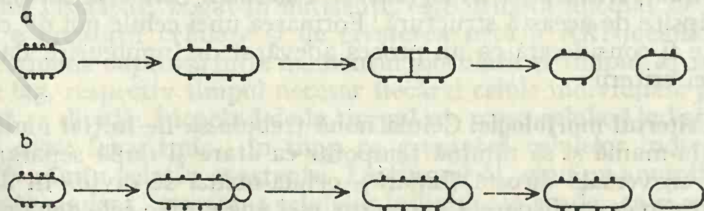
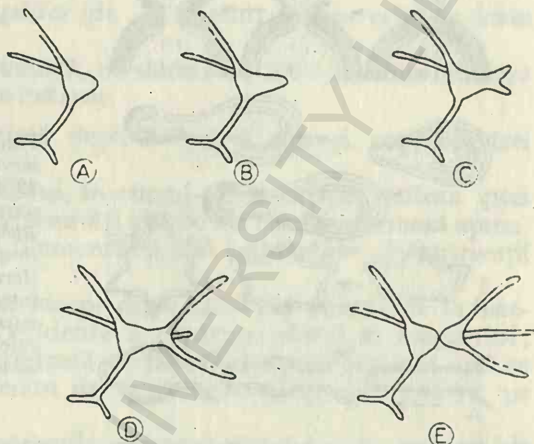


Fig. 197. — Reprezentarea schematică a diferenţelor dintre diviziunea transversală directă (a) şi înmugurire (b). Punctele negre pe suprafaţa celulelor reprezintă subunităţi ale peretelui celular. În diviziunea directă, materialul peretelui celular este distribuit egal celor două celule-surori, deşi nu totdeauna în modul ilustrat în *a*. În înmugurire, celula-mamă reţine integral subunităţile peretelui celular originar, în timp ce mugurele este acoperit integral cu material parietal nou format.

la unele bacterii prostecate care înmuguresc, cum este *Ancalomicrobium* (fig. 198).

În plus, în diviziunea simplă, în cursul întregului proces de creștere, celula rămîne simetrică în raport cu axul longitudinal și transversal, fiecare celulă-fiică primind un număr aproape egal de subunități moleculare ale

Fig. 198. — Formarea mugurilor la *Ancalomicrobium adetum*. Bacteria crește într-un singur punct al celulei (A). Cînd ajunge într-o anumită fază, începe să se diferențieze un alt mugure și să formeze prosteca (C). Celula-mamă cu prosteca bifurcată își păstrează identitatea (E) și este din nou gata să repete ciclul de diviziune (după Staley, 1971).



peretelui celular. În cazul bacteriilor cilindrice, care cresc exponențial prin procese ideale de intercalare (în care structurile noi și vechi ale peretelui și ale materialului celular sînt distribuite egal în toată celula care crește), rezultă două celule gemene, echivalente în momentul diviziunii din toate punctele de vedere (morfologic, structural și fiziologic). Durata de viață a unor astfel de celule este egală cu durata timpului de generație. În înmugurire, simetria este menținută în raport cu axul longitudinal, nu însă și cu axul transversal. Obișnuit, mugurii sînt formați înainte de a deveni „nucleați", respectiv înainte de segregarea materialului genetic. Ei sînt inițial mici, sferici și cresc în diametru, în cursul creșterii peretelui celular, pînă ajung la dimensiunile celulei-mamă, formînd, uneori, imaginea „în oglindă" a acesteia. Datorită acestor particularități, mugurele are o identitate individuală și suferă, paralel cu dezvoltarea sa, un proces de îmbătrînire.

3) **Criteriul funcțional.** Mugurele trebuie să reprezinte singurul mod de formare al unei celule noi la specia respectivă (Hirsch, 1974). Există cel puțin 6 modalități diferite de înmugurire, care duc la multiplicare celulară și, în toate cazurile, structura inițială a mugurelui este mult mai mică decît a celulei-mamă care l-a produs (fig. 199).

Creșterea peretelui celular sau extinderea celulei poate fi unidirecțională, realizîndu-se fie totdeauna la același pol al celulei, fie alternativ la fiecare pol al celulei, sau bidirecțională, în sensul că ambii poli ai celulei produc celule-fiice noi. Procesul de diviziune care duce la separarea mugurelui este, în esență, similar celui descris în cazul diviziunii simetrice. Modul de creștere obligatoriu polar și diviziunea prin înmugurire determină deosebiri profunde în raport cu multiplicarea tipică a bacteriilor care cresc prin procese de intercalare a substanței nou sintetizate (Whittenbury și Dow, 1977).

Procesul de înmulţire prin înmugurire, care evoluează cu grade diferite de complexitate morfologică, în funcţie de natura bacteriilor respective (fig. 200), a fost studiat în detaliu la *Rhodomicrobium vannielii* de Whittenbury şi

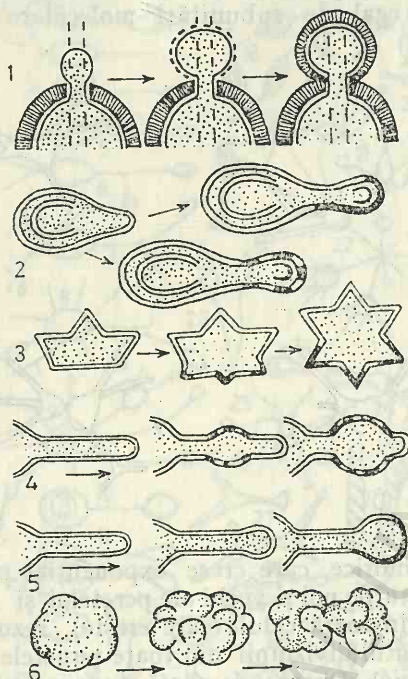


Fig. 199. — Tipurile de înmugurire observate la bacterii (după Hirsch, 1974): I. *Planctomyces*, *Pasteuria*, *Mycoccus*. 2. „Umflare" terminală la *Rhodopseudomonas* şi *Nitrobacter*. 3. *Rrosthecomicrobium*, *Ancalomicrobium* (formă de stea). 4. Formare de muguri intercalaţi la *Pedomicrobium* şi *Rhodomicrobium*. 5. Înmugurire terminală a hifelor la *Hyphomicrobium* şi *Hyphomonas*. 6. Formare de lobuli la *Sulfolobus* şi *Nitroscolobus*.

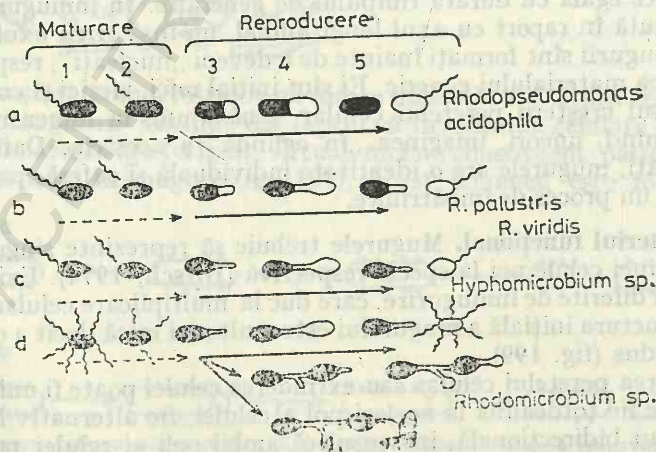


Fig. 200. — Bacteriile care înmuguresc, aranjate după gradul de complexitate morfologică şi a ciclului celular. În toate cazurile, mobilitatea (1), pierderea flagelilor (2), maturarea celulei (3), sinteza celulei-fiice prin creştere obligatoriu polară (4) şi diviziunea celulară asimetrică (5) duc la formarea unei celule-fiice imature şi unei celule-mamă mature (după Whittenbury şi Dow, 1977).

Dow (1977), Moore (1981) ş.a. Diferitele faze cuprinse între apariţia unei celule tinere „roitoare" şi formarea primei generaţii de celule prin înmugurire includ două secvenţe majore: maturarea şi reproducerea.

Maturarea durează ~ 130—150 min şi este subdivizată în trei faze:

— *perioada mobilă*, cu durata de 20—30 min, în care celula „roitoare" are flageli peritrichi şi dimensiuni de 1,5 × 0,8 μm;

— *perioada de pierdere a flagelilor* (de ~ 15 min), în care celulele devin imobile;

— perioada de maturare terminală, cu durata de 100—120 min, în care nu mai apar modificări morfologice externe.

Faza reproductivă este iniţiată după 200—240 min şi cuprinde trei etape succesive:

— *faza de formare a filamentului*, în cursul căreia are loc sinteza unui filament, la una sau la ambele extremităţi polare ale celulei; durează aprox. 50 min; durata ei, ca şi lungimea filamentului sînt influenţate de nutrienţii din mediu;

— *faza de sinteză a mugurelui* începe după 220—250 minute de la începutul ciclului printr-o „umflare" evidentă a capătului distal al mugurelui; durează 150—180 min; este caracterizată de faptul că la un moment dat se formează un singur mugure, indiferent de numărul de filamente prezent pe celulă;

— *formarea celulei-fiice* corespunde separării fiziologice a acesteia de celula-mamă, fără modificarea dimensiunilor. Aceasta se realizează fie prin diviziune binară la nivelul joncţiunii filamentului cu celula-mamă, fie prin formarea unui „dop" în filament, la mică distanţă de celula-fiică. În primul caz, celula-fiică mobilă se desprinde fără a reţine vreo parte din filamentul celulei-mamă. Separarea printr-un „dop" situat pe filament are ca rezultat formarea de lanţuri de celule (fig. 201).

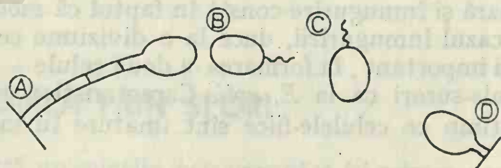


Fig. 201. — Ciclul de viaţă la *Caulobacter*. Celula-mamă (A) are vîrsta a patru diviziuni. Cele trei celule „roitoare" (B—D) au o vîrstă crescîndă, de la stînga la dreapta. Cea mai veche (D) a format peduncul (după Postgate, 1976).

Dezvoltarea ulterioară. Cînd celula-mamă eliberează o celulă „roitoare", polul filamentului acesteia devine disponibil pentru a o doua rundă de reproducere. În unele cazuri însă, celula-mamă formează un al doilea mugure, la extremitatea opusă celui dintîi. Procesul continuă prin formarea de ramificaţii pe filamentele cele mai recent formate, pentru a forma filamente multicelulare încîlcite, deoarece, în cazul creşterii unipolare, a doua celulă-fiică se formează pe un filament ramificat din primul filament, apoi a doua celulă-fiică se formează pe un filament ramificat din primul, a treia celulă-fiică se formează pe o ramificaţie a celui de-al doilea filament, a patra pe o ramificaţie a celui de-al treilea filament etc. (fig. 202). În toate cazurile, datorită unui mecanism necunoscut, o celulă-mamă nu formează mai mult de 4 celule-fiice, indiferent de condiţiile de mediu, în timp ce celulele progene continuă să îmbogăţească cultura care conţine celula-mamă.

Consecinţa acestui mod de diviziune este că celula-fiică, imatură în momentul formării, trebuie să-şi formeze structurile interne şi filamentul (prosteca) pentru a deveni structural şi fiziologic echivalentă celulei-mamă, care i-a dat naştere. În schimb, „îmbătrînirea" este un proces evident, care se extinde de-a lungul întregului ciclu de viaţă al celulelor-mamă, care sînt „muritoare", deoarece suferă un număr limitat de cicluri reproductive.

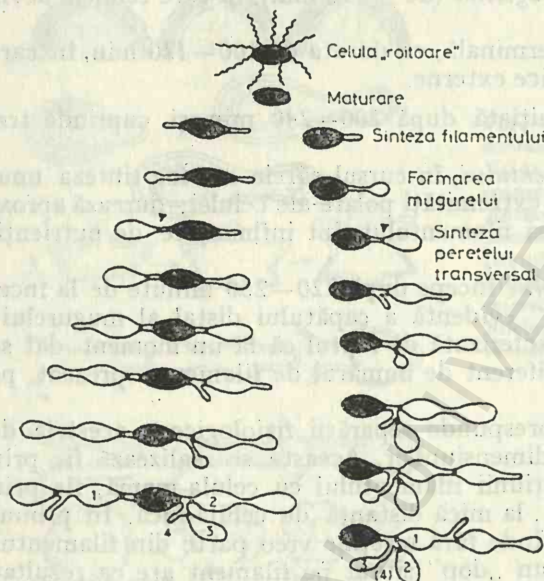


Fig. 202. — Reprezentarea schematică a creşterii vegetative şi a dezvoltării celulelor „roitoare" la *Rhodomicrobium*, tulpina Rm5, în culturi discontinue (după Whittenbury şi Dow, 1977).

După Whittenbury şi Dow (1977), diferenţa esenţială între diviziunea binară şi înmugurire constă în faptul că modul obligatoriu de creştere polară, în cazul înmuguririi, duce la o diviziune celulară asimetrică şi, ceea ce este mai important , la formarea a două celule — „mamă şi fiică" — în loc de două celule-surori ca la *E. coli*. Caracteristica celulelor-mame este îmbătrînirea, în timp ce celulele-fiice sînt imature în momentul formării lor.

MULTIPLICAREA PRIN FRAGMENTARE

O formă specială de reproducere vegetativă este observată la cele mai multe actinomicete (*Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae, Frankiaceae* şi *Nocardiaceae*). A fost în mod deosebit studiată la *Nocardia corallina* şi *N. erythropolis*. Proba experimentală a acestei modalităţi de diviziune multiplă a bacteriilor a fost adusă de Adams (1966), care a arătat că în prima treime a ciclului are loc o creştere activă, măsurabilă prin valorile masei celulare, fără creşterea numărului celulelor viabile. Ulterior, datorită fragmentării multiple, masa celulară rămîne constantă, în timp ce numărul celulelor viabile creşte foarte mult.

Ciclul de creștere la *Nocardia* include o perioadă de dezvoltare hifală cenocitică, în care alungirea se realizează prin adăugarea de material nou numai la extremitățile hifei (fig. 203) și la locul de origine a ramificațiilor. Rata de creștere la cele două extremități ale filamentului este de ~ 0,02 μm/min și mai lentă în cazul ramificațiilor nou apărute. Primul sept transversal apare

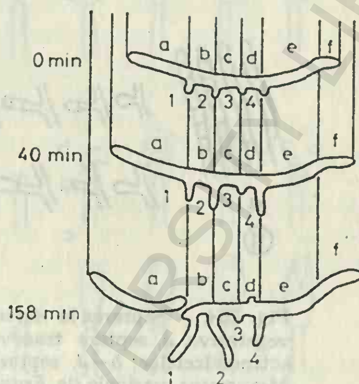


Fig. 203. — Creșterea hifelor la *Nocardia corallina* prin alungirea extremităților. Cifrele indică rata de creștere pentru porțiunile indicate ale hifelor (după Brown și Clark, 1966).

aproape de mijlocul unei hife și progresează secvențial, de-a lungul filamentului spre extremități. Deci, fragmentarea apare inițial în părțile mai vechi ale hifei (Brown și Clark, 1966) și determină apariția de fragmente scurte, egale ale căror extremități devin imediat situsuri de creștere. Deși procesele de formare a septurilor și de segregare a genomului sînt destul de bine coordonate (Ensign, 1971), spre sfîrșitul fazei de fragmentare, viabilitatea diferitelor fragmente scade, probabil pentru că unele fragmente sînt lipsite de nucleu, datorită formării premature a septurilor, fapt care scade eficiența procesului (Adams, 1966).

MULTIPLICAREA PRIN SPORI

Actinomicetele care păstrează un miceliu nefragmentat (și adesea neseptat) pentru perioade lungi de timp din ciclul lor de viață se reproduc, de regulă, prin formarea de *exospori**) (spori de dispersare) de tip asexuat, dispuși de regulă pe hifele aeriene, în lanțuri de diferite lungimi sau în vezicule sporale speciale (sporangii). Unele actinomicete care formează exospori prezintă o teacă externă ce învelește hifele sporulante, ca un ciorap. Ea se comportă ca o entitate independentă de transformările peretelui sporoforului și, final, formează învelișul veziculelor sporale. Altele (*Micromonospora*, *Nocardia*, ca și hifele de substrat) sînt lipsite de teaca de înveliș (Williams și colab., 1973).

Spectrul larg de modificări structurale asociate cu procesul de formare a exosporilor la actinomicete, prin septarea hifelor, pledează pentru ipoteza

*) Unele actinomicete termofile (*Thermoactinomyces* sp.) formează *endospori* unici, termorezistenți pe miceliul aerian și de substrat (cu aceeași semnificație ca endosporii bacililor Gram-pozitivi). Ei rămîn în citoplasma hifei parentale sau sînt parțial extrudați în timpul maturării.

că sporularea este, în acest caz, o modalitate modificată de diviziune a celulelor procariote (Hitchins și Slepcky, 1969; Kalakaoutskii și Agre, 1976) (fig. 204, 205).

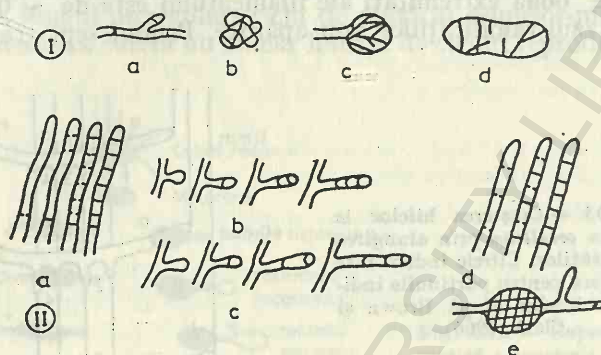


Fig. 204. — Septarea la *Actinomycetes*. **I.** Septarea celulelor vegetative. *a*, septare transversală obișnuită la majoritatea actinomicetelor; *b—d*, septare în planuri diferite intîlnită la *Mycococcus*, vezicule de *Frankia*, clamidospor de *M. chalcea*. **II.** Septarea sporogenă la *Streptomyces* sp. (*a*), diviziune secvențială bazipetală la *Micropolyspora* (*b*), acropetală la *Pseudonocardia* sp. (*c*), „în cascadă'' la *Actinomadura dassonvillei* (*d*) și în planuri perpendiculare la *Dermatophilaceae* (*e*) (după Kalakaoutskii și Agre, 1976).

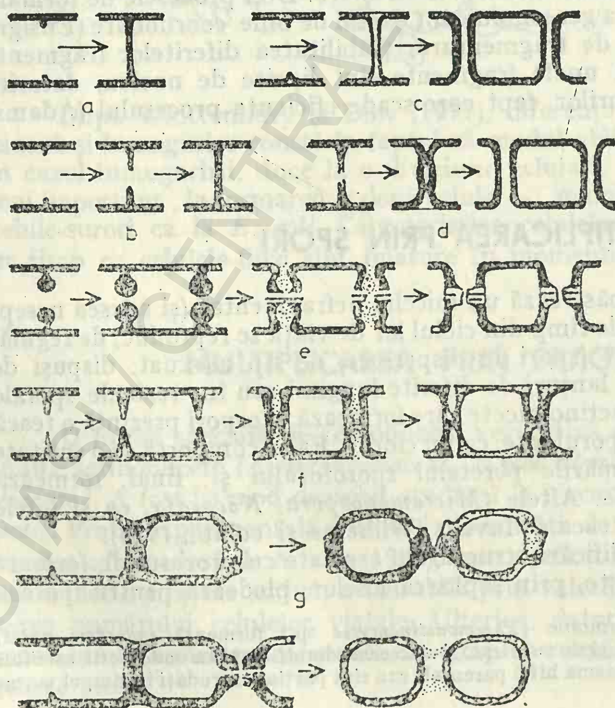


Fig. 205. — Organizarea structurală și etapele formării septurilor la actinomicete. **a, b.** Septuri uni- sau tristratificate prezente la majoritatea celulelor vegetative studiate. **c, d.** Septuri clivate, prezente în hifele care se fragmentează la *Nocardia* (c) și în hifele sporulante la *S. coelicolor* și multe actinomicete. **e, f.** Septuri de sporulare cu contur multiplu: la *S. viridochromogenes* (e) și la *S. ribosidifuscus* (f). **g, h.** Septuri de sporulare cu „tampon" intersporal, care persistă în lanțul sporal matur (g) ca la *A. dassonvillei* sau care este distrus (h) în cursul fazelor tardive de formare a sporilor *(M. rectivirgula)*. Zonele negre — perete celular și material septal; zonele punctate — material intersporal (după Kalakaoutskii și Agre, 1976).

Etapele formării exosporilor. Sharples, Williams și Bradshaw (1974) au studiat sporogeneza la familia *Actinoplanaceae,* formată din actinomicete cu spori în sporangii*), cu formă, dimensiuni și număr de spori variabile (fig. 206).

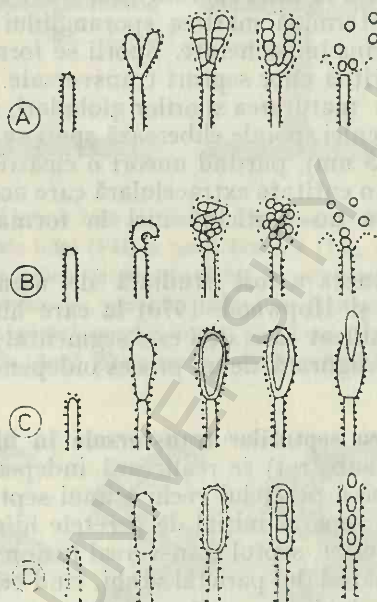


Fig. 206. — Stadiile de formare a sporilor la *Actinoplanes* (A), *Streptosporangium* (B), *Planomonospora* (C) și *Dactylosporangium* (D) (după Sharples 1974).

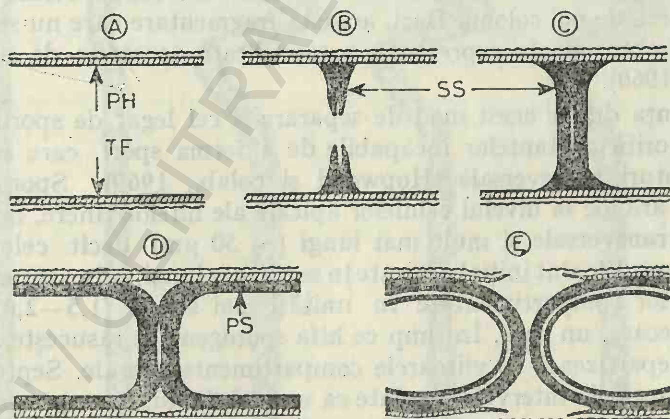


Fig. 207. — Formarea peretelui sporal. **A.** Inițial, învelișul celular este format din peretele hifei (PH) și teaca fibroasă (TF). **B.** Formarea septului de sporulare (SS). **C.** Formarea peretelui viitorului spor (PS). **D.** În timp ce sporii se rotunjesc și încep să se separe, se maturează, iar peretele sporal continuă să se îngroașe (**E**) (după Wildermuth și Hopwood, 1970).

*) Termenul de sporangiu, recomandat de Couch (1949), este adecvat — prin analogie cu cel folosit pentru bacteriile sporulate Gram-pozitive *(Bacillus)* — numai limitat la actinomicetele cu spori endogeni. Pentru structurile acoperite de o teacă de înveliș, rezultate din fragmentarea hifelor, este recomandabil termenul de *veziculă sporală*, propus de Cross (1970).

Hifele aeriene implicate în sporogeneză, avînd peretele hifal acoperit de o teacă externă, cresc la vîrf, mărindu-şi diametrul de 2—5 ori, şi formează un număr de ramificaţii fine în interiorul tecii celulei parentale. Apariţia unui sept transversal la baza sporangiului tînăr este urmată de o creştere a ramificaţiilor ce determină mărirea sporangiului care conţine un agregat de hife sporogene strîns împachetate. Sporii se formează prin fragmentarea lor, consecutivă apariţiei unor septuri transversale. După o serie de modificări structurale are loc maturarea sporilor globulari, cu formarea structurii lor interne. Ruperea veziculei sporale eliberează spori cu ∅ de 1—1,2 µm, cu peretele neted (gros de ~ 15 nm), purtînd uneori o cicatrice la locul fostei legături în lanţ. „Teaca" este o entitate extracelulară care acoperă sporii în tot timpul formării lor, dar care nu participă nici la formare, nici la definirea formei lor (fig. 207).

Sporogeneza a fost studiată de asemenea la *Streptomyces coelicolor* (Wildermuth şi Hopwood, 1970) la care hifele vegetative produc un miceliu abundent ramificat care, deşi este segmentat, nu se fragmentează uşor. Multiplicarea este asigurată de un proces independent de formarea şi de germinarea sporilor.

Formarea septurilor transversale în hifele vegetative aeriene (posibil şi în cele de substrat) se realizează independent de sporulare, prin apariţia pe faţa internă a peretelui vechi a unui sept inelar, care creşte progresiv spre interior, fiind separat iniţial de peretele hifal vechi, printr-o linie întunecată (fig. 208). Ulterior, septul transversal fuzionează cu peretele hifei, îndepărtînd o parte din materialul parietal vechi, cînd celulele se rotunjesc la extremităţi. Deoarece este dublu, în cazul unor forţe mecanice mai puternice se poate rupe la acest nivel, astfel încît fragmentele rezultate care conţin celule viabile pot iniţia formarea de noi colonii. Deci, această fragmentare care nu se realizează natural (spontan) poate reprezenta o modalitate accesorie de multiplicare (Hopwood, 1960).

Diferenţa dintre acest mod de separare şi cel legat de sporulare a fost făcută datorită mutantelor incapabile de a forma spori, care continuă să formeze septuri transversale (Hopwood şi colab., 1969). Sporogeneza la *S. coelicolor* are loc la nivelul celulelor apicale ale hifelor tinere, iniţial lipsite de septuri transversale şi mult mai lungi (~ 50 µm) decît cele neapicale (~3 — 15 µm). Ele sînt iniţial divizate în segmente lungi, prin septuri transversale şi ulterior compartimentate în unităţi mai scurte (1,5—2,0 µm), care formează, fiecare, un spor. În timp ce hifa sporogenă se răsuceşte, materialul nuclear se repartizează în viitoarele compartimente sporale. Septurile transverse se formează la intervale regulate ca un inel dublu, care creşte spre interiorul hifei, dezvoltarea lor fiind sincronizată pe o anumită lungime a hifei (fig. 209). Septarea este foarte rapidă şi însoţită de clivarea celor două straturi adiacente ale septului, pentru a forma sporii. Maturarea lor implică, practic, dublarea grosimii peretelui iniţial, prin adăugarea de material nou pe faţa sa internă şi apariţia unor constricţii marginale, între compartimentele sporale. Sporii maturi sînt menţinuţi în lanţuri care se rup uşor datorită învelişului fragil, care constă din teaca fibroasă şi părţi ce se dezintegrează ale peretelui hifal vechi.

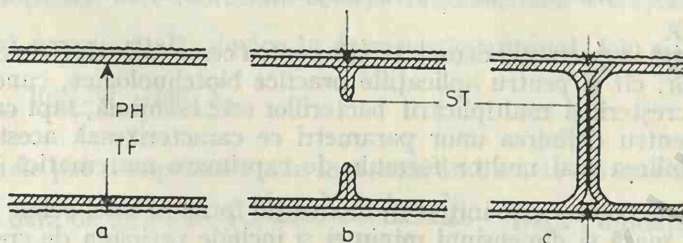


Fig. 208. — Formarea septului transversal într-o hifă aeriană de *Streptomyces coelicolor*. Inițial (a), învelișul celular este format din peretele hifal (PH) și teaca fibroasă (TF). Materialul nou parietal este depus (b) sub forma unui disc inelar, cu grosime dublă, separat inițial de peretele hifal vechi printr-o dungă neagră (↓). Ulterior (c), peretele transversal fuzionează cu peretele hifal vechi, îndepărtînd o porțiune din materialul parietal vechi (↓). Final, septul transversal complet (ST) este evident dublu (după Wildermuth și Hopwood, 1970).

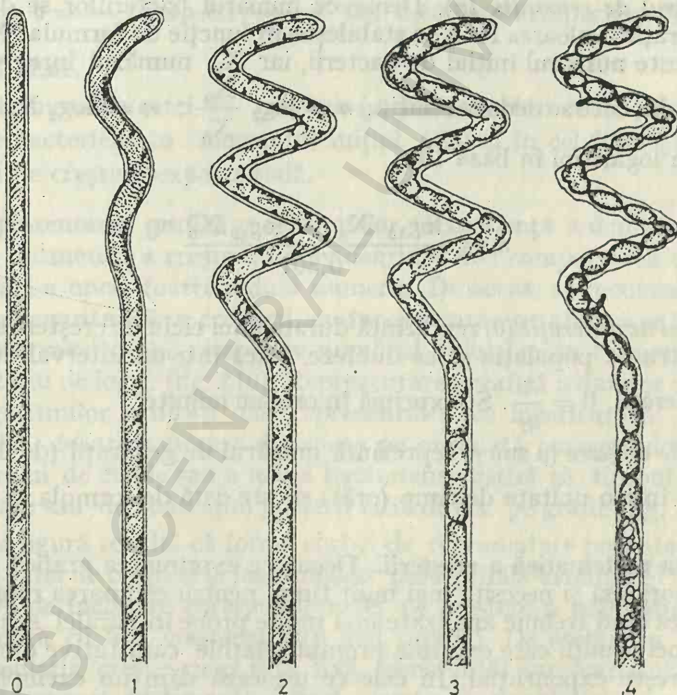


Fig. 209. — Fazele sporulării la *Streptomyces coelicolor*. După faza de creștere (0), hifele sporulante se divid în celule lungi, prin intermediul unor septuri transversale obișnuite și încep să se răsucească (1). Zona apicală este segmentată în compartimente corespunzînd mărimii sporilor, prin septuri de sporulare (2). Pereții celulari se îngroașă. Apar constricții între sporii tineri (3). Pe măsură ce se maturează, sporii se rotunjesc și se separă. Unii încep să germineze imediat după maturare (după Wildermuth, 1970).

ESTIMAREA CREŞTERII BACTERIILOR

Datorită importanţei deosebite atît pentru cercetările de fiziologia microorganismelor, cît şi pentru aplicaţiile practice biotehnologice, cunoaşterea şi aprecierea creşterii şi multiplicării bacteriilor este esenţială, fapt care explică interesul pentru definirea unor parametri ce caracterizează acest proces şi pentru stabilirea mai multor formule de exprimare matematică şi grafică.

Ciclul de creştere este iniţiat în momentul formării unei celule bacteriene (cînd are o masă şi dimensiuni minime) şi include perioada de creştere pînă atinge dimensiuni şi masă critice, urmată de diviziune, cu formarea a două celule-surori.

Numărul bacteriilor dintr-o populaţie (X) se exprimă în cazul populaţiilor cultivate pe medii lichide, raportat la unitatea de volum de mediu (cel mai adesea X/ml).

Masa celulară (M) a X bacterii se exprimă în mod obişnuit ca miligrame de greutate uscată pe ml de cultură.

Numărul de generaţii (*n*). Deoarece numărul bacteriilor se dublează la fiecare generaţie, valoarea lui *n* se stabileşte în funcţie de formula: $X_n = 2^n X_0$, în care X_0 este numărul iniţial de bacterii, iar X_n, numărul înregistrat după *n* generaţii, din care se deduce relaţia: $n = \log_2 \frac{X_n}{X_0}$; $n = \log_2 X_n - \log_2 X_0$

Exprimat în logaritmi în baza 10:

$$n = \frac{\log_{10} X_n - \log_{10} X_0}{0{,}301}$$

Timpul de generaţie (θ) reprezintă durata unui ciclu de creştere sau timpul necesar pentru ca populaţia să se dubleze. Dacă într-un interval de timp (t) există *n* generaţii, $\theta = \frac{t}{n}$. Se exprimă în ore sau minute.

Rata de creştere (μ sau *r*) reprezintă numărul de generaţii (de dublări sau de diviziuni într-o unitate de timp (oră)) şi este dată de formula: $\mu = \frac{n}{t} = \frac{1}{\theta}$

Analiza matematică a creşterii. Deoarece exprimarea grafică a creşterii este mai laborioasă şi necesită mai mult timp, pentru estimarea rapidă a creşterii, mai ales cînd trebuie analizate mai multe probe în paralel, se recomandă utilizarea unei ecuaţii care exprimă prompt relaţiile cantitative dintr-o populaţie care creşte exponenţial. În cele ce urmează dăm un exemplu concret.

O populaţie bacteriană, avînd iniţial (în inoculum) numărul de celule X_0, devine după o diviziune $X_1 = 2\ X_0$, după două diviziuni $X_2 = 2^2 X_0$ şi după *n* diviziuni $X_n = 2^n\ X_0$. Notăm cu μ, rata creşterii constante — caracteristică fazei exponenţiale — adică numărul de diviziuni pe unitatea de timp, cu X_t, numărul de celule la sfîrşitul perioadei şi cu *t*, durata de timp de la X_0 la X_t, exprimată în ore sau în minute. Numărul de generaţii (*n*) într-un interval de timp *t* va fi prin definiţie $n = \mu t$, iar numărul celulelor bacteriene prezente

în culturi la sfîrşitul perioadei respective va fi dat de relaţia: $X_t = 2^{\mu t} X_0$. Această formulă, care reprezintă ecuaţia fundamentală a creşterii bacteriilor sub formă exponenţială, devine în forma sa logaritmică: $\log_2 \frac{X_t}{X_0} = \mu t$ sau încă $\mu = \frac{\log_2 X_t - \log_2 X_0}{t}$.

Datele pot fi exprimate şi în logaritmi în baza 10, în care caz rata creşterii este dată de formula: $\mu = \frac{\log_{10} X_t - \log_{10} X_0}{0{,}301\ t}$. Dacă numărul iniţial al bacteriilor (X_0) este de 100 000 ($\log_{10} X_0 = 5$), numărul final (X_t) este de 10 milioane ($\log_{10} X_t = 7$), iar durata observaţiei $t = 4$ ore, $\mu = \frac{7-5}{0{,}301 \times 4} = \frac{2}{1{,}204}$, din care se deduce că $\mu = 1{,}66$ diviziuni pe oră. Timpul de generaţie (θ), respectiv timpul necesar pentru dublarea populaţiei este dat de relaţia $\theta = \frac{1}{\mu}$, respectiv $\frac{1}{1{,}66}$ sau 0,60 ore (respectiv 36 minute) în exemplul citat.

Determinarea ratei de creştere (μ) necesită deci cunoaşterea numărului de celule bacteriene în momentul iniţial (X_0) şi în cel final (X_t), în cursul perioadei de creştere exponenţială.

Reprezentarea grafică a rezultatelor. Experienţa a demonstrat că reprezentarea aritmetică a creşterii nu evidenţiază nici comportarea unei populaţii mari şi nici a uneia foarte redusă numeric. De aceea, se recomandă reprezentarea semilogaritmică a creşterii, cu înregistrarea pe abscisă a timpului şi pe ordonată a rezultatelor, respectiv numărul celulelor, în termeni de logaritmi în baza 2 sau de $\log_{10}$. (fig. 210). Reprezentarea grafică a datelor nu depinde de baza logaritmilor utilizaţi, dar reprezentarea ca logaritm în bază 2 este preferabilă, deoarece fiecare diviziune pe ordonată corespunde unei dublări a numărului de celule sau a masei bacteriene, astfel că timpul de diviziune (de dublare sau de generaţie) poate fi citit direct pe grafic (fig. 211).

Din figură rezultă că forma curbei de reprezentare permite determinarea grafică a ratei de creştere şi face imediat perceptibilă evoluţia ei într-o cultură. Gradul ei de înclinare corespunde ratei de creştere a populaţiei (cu cît este mai abruptă cu atît creşterea este mai rapidă). De asemenea, ea ilustrează dacă populaţia creşte cu o rată fixă (constantă) sau variabilă (mărită sau scăzută în raport cu timpul). Astfel, creşterea populaţiei consecutivă diviziunii bacteriilor cu ritm constant (la acelaşi interval de timp) se exprimă printr-o linie dreaptă. Creşterea exprimată printr-o curbă cu concavitatea în sus corespunde situaţiei în care diviziunile sînt din ce în ce mai rapide ($\mu \nearrow$), iar curba cu concavitatea în jos exprimă o creştere care se încetineşte progresiv ($\mu \swarrow$).

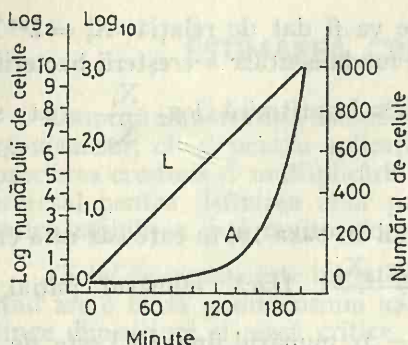


Fig. 210. — Creşterea exponenţială a bacteriilor, după incubarea unei celule care se divide regulat la 30 min. L — curba logaritmică a numărului de celule faţă de timp; A — curba aritmetică a numărului de bacterii în raport cu timpul.

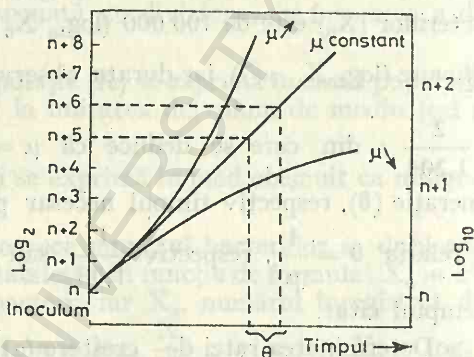


Fig. 211. — Reprezentarea semilogaritmică a creşterii bacteriilor, utilizînd pe ordonată $\log_2$ (stînga) şi $\log_{10}$ (dreapta) $\mu\nearrow$ — rata de creştere progresivă în raport cu timpul; $\mu\searrow$ — rata de creştere care diminuă cu timpul; θ — timpul de generaţie (intervalul de timp în care $\log_2$ al populaţiei creşte cu o unitate).

Vîrsta bacteriilor este variabilă în funcţie de condiţiile de cultivare. În culturile sincrone, toate bacteriile prezente în populaţie se găsesc în acelaşi stadiu al ciclului lor de creştere şi în consecinţă au aceeaşi vîrstă. În culturile asincrone, vîrsta bacteriilor este diferită de la o celulă la alta.

Experimental, vîrsta bacteriilor se determină măsurîndu-le dimensiunile, presupunînd că mărimea celulei este o funcţie lineară a vîrstei. Dacă împărţim bacteriile pe categorii se obţin clasele de vîrstă de la $0 - a_1$, $a_1 - a_2$, $a_2 - a_3$ ş.a.m.d. Distribuţia lor în funcţie de vîrstă poate fi înregistrată într-o histogramă, în care înălţimea fiecărui dreptunghi reprezintă numărul de indivizi din clasa corespunzătoare (fig. 212). Rezultatele pot fi exprimate şi pe baza frecvenţei bacteriilor, în funcţie de vîrstă, în care caz înălţimea fiecărui dreptunghi din histogramă reprezintă frecvenţa indivizilor din clasa de vîrstă respectivă în populaţia totală.

Randamentul creşterii. Creşterea totală a bacteriilor reprezintă diferenţa dintre masa şi respectiv numărul de celule aflate în mediu, cînd populaţia intră în faza finală de creştere, şi masa sau numărul de celule iniţiale, din inoculum. Masa de material celular produs per unitate de masă de nutrient consumat este o constantă numită *randament de creştere*.

În cazul microorganismelor chemoheterotrofe, randamentul creşterii furnizează un indicator al eficienţei cu care substratul asigură biosinteza constituenţilor celulari. Spre exemplu, în cazul bacteriei *Pseudomonas* sp. cultivată pe un mediu sintetic, avînd fructoza ca unică sursă de carbon şi energie, s-a demonstrat că utilizarea unui gram de fructoză permite producerea a 0,4 g masă celulară uscată. Cum conţinutul în C al fructozei este de 40 %, iar cel al materialului celular de 50 %, rezultă că 0,50 % din carbonul zaharului este utilizat de bacterie pentru a face sinteza de material celular, iar cealaltă

jumătate este pierdută ca bioxid de carbon. Capacitatea bacteriilor heterotrofe de a converti în material celular fracţiunea C din mediu variază între 20 şi 50 %, datorită diferenţelor în eficienţa cu care bacteriile respective pot folosi substratul pentru a produce ATP (Stanier, 1976).

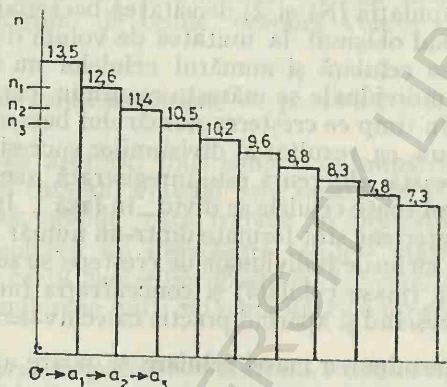


Fig. 212. — Histogramă reprezentînd distribuţia bacteriilor în funcţie de vîrstă, într-o populaţie. n_1, n_2, n_3 reprezintă numărul bacteriilor corespunzător categoriilor de vîrstă $0-a_1$, a_1-a_2, a_2-a_3 etc. (după Elmerich şi Hubert, 1975).

În cazul microorganismelor fermentative care se dezvoltă pe medii organice complexe, substratul fermentabil este aproape integral convertit la produşi finali, cu producere de ATP, în timp ce sinteza de material celular are loc pe seama altor nutrienţi organici. Randamentul creşterii este foarte constant, fiind apreciat la ~ 10 g material celular / gram-mol de ATP produs. Ca urmare, randamentul creşterii calculat în raport cu cantitatea de glucid fermentat variază în funcţie de cantitatea de ATP produs în cursul diferitelor fermentaţii. Datorită acestui fapt, randamentul creşterii bacteriei *Zymomonas mobilis* care produce un mol ATP per mol de substrat în cursul fermentaţiei alcoolice pe calea Entner—Doudoroff este numai jumătate din cel al levurii *S. cerevisiae* sau al bacteriilor homolactice (tabelul nr. 40).

Tabelul nr. 40

Randamentul creşterii unor microorganisme, calculat în funcţie de cantitatea de glucoză fermentată şi de ATP produs (după Stanier, 1976)

Microorganismul	Calea metabolică şi fermentaţia produsă	ATP format per mol de glucoză fermentată	Randamente molare ale creşterii, exprimate în grame material celular per mol de	
			Glucoză fermentată	ATP produs
Saccharomyces cerevisiae	Embden—Meyerhoff—Parnas Alcoolică	2	21	10,5
Streptococcus faecalis	Embden—Meyerhoff—Parnas Homolactică	2	22	11
Lactobacillus delbrueckii	Embden—Meyerhoff—Parnas Homolactică	2	21	10,5
Zymomonas mobilis	Entner—Doudoroff Alcoolică	1	8,6	8,6

MĂSURAREA POPULAŢIILOR BACTERIENE

Determinările cantitative ale unei populaţii bacteriene se fac în funcţie de doi parametri: 1) concentraţia celulară sau numărul celulelor care constituie populaţia (N) şi 2) densitatea bacteriană sau masa celulară (M), raportate în mod obişnuit la unitatea de volum de mediu (cel mai frecvent la ml).

Masa celulară şi numărul celulelor nu sînt echivalente, deoarece masa celulelor individuale se măreşte continuu cu timpul, în cursul procesului de creştere, în timp ce creşterea numărului bacteriilor individuale este un proces discontinuu, ca rezultat al diviziunilor succesive ce au loc la intervale fixe de timp. Această diferenţă este înregistrată semnificativ în cazul culturilor sincrone, cînd toate celulele se divid „în fază". În culturile obişnuite, cînd populaţiile bacteriene sînt formate dintr-un număr mare de celule şi diviziunea este sincronă, ciclurile individuale de creştere se suprapun în aşa fel încît, statistic, densitatea (masa celulară) şi concentraţia (numărul) bacteriilor se suprapun, ambele crescînd şi apărînd practic ca echivalente.

Determinarea masei celulare se poate aprecia prin mai multe metode:

1) *Determinarea greutăţii uscate* raportată la 1 ml mediu, prin cîntăriri repetate, după uscare la 100—110°C pînă la greutatea constantă. Tehnica este exactă, dar lungă şi fastidioasă, necesită cantităţi importante de cultură şi debarasarea lor prin spălări repetate de sărurile minerale din mediu, care ar putea falsifica rezultatele. Greutatea uscată, care reprezintă ~ 20—25 % din cea umedă, este un indicator mai exact decît aceasta, deoarece celulele pot absorbi sau pierde apă în cantităţi necorelate cu masa protoplasmatică.

2) *Măsurătorile indirecte* se pot face:

a) prin determinarea conţinutului în N total sau N proteic (aceasta din urmă este mai exactă, pentru că evită erorile produse de grosimea variabilă a peretelui celular);

b) prin determinarea unor activităţi metabolice, cum ar fi consumul de O_2 (la bacteriile aerobe rata utilizării O_2 este obişnuit proporţională cu masa celulară), producerea de CO_2 (la bacteriile anaerobe), formarea unui anumit produs de fermentaţie sau rata de reducere a unui colorant.

3) *Măsurătorile de turbiditate* sînt simple şi directe şi se pot efectua pe două căi:

a) prin spectrofotometrie, care măsoară modul în care suspensia bacteriană reduce transmiterea luminii, exprimîndu-l fie în procente de transmitere (x), fie ca densitate optică (DO)*), care reprezintă o funcţie logaritmică a procentului de transmitere;

b) prin nefelometrie, care apreciază gradul de dispersare al luminii de o suspensie bacteriană, măsurînd mult mai sensibil nivelele de turbiditate scăzută.

Turbiditatea este mai strîns corelată cu greutatea celulară decît cu numărul celulelor şi de aceea reprezintă o metodă rapidă pentru a aprecia creşterea masei celulare a culturilor. Pentru a corela gradul de turbiditate

---

*) $DO = 2 - \log_{10} X$, în care X este % de transmitere. Pentru un $X = 100\%$ ($\log_{10} 100 = 2$), $DO > 0$. (DO variază de la 0 la ∞).

cu masa celulară este necesară utilizarea unei curbe de calibrare, în raport cu fiecare organism studiat, evitînd astfel erorile produse de diferențele individuale în gradul de dispersie a luminii. Metodele chimice și turbidimetrice sînt frecvent folosite în practică, în ciuda inconvenientelor lor (sînt mai puțin sensibile decît determinarea numărului de celule, necesită volum și densități mari de suspensii celulare).

Determinarea numărului de celule bacteriene se poate face, de asemenea, prin mai multe tehnici:

1) *Numărătoarea directă* cu ajutorul unei camere de numărat de tipul hemocitometrelor (de exemplu, camera Thoma) este destul de dificilă, mai ales în cazul microorganismelor mobile, care trebuie în prealabil omorîte.

Prezintă numeroase dificultăți: nu deosebește celulele viabile de cele moarte; este greu de aplicat în cazul bacteriilor foarte mici; necesită suspensii destul de dense ($\sim 1 - \sim 10$ milioane /ml); nu oferă date cu un grad înalt de exactitate.

2) *Numărătoarea cu ajutorul dispozitivelor electronice* construite pe principiul aspirării celulelor individuale, suspendate într-o soluție de electroliți printr-un microorificiu care stabilește o comunicare între două compartimente, cu potențial diferit. Trecerea fiecărei celule prin orificii modifică rezistența electrică a sistemului și dă un impuls, care este înregistrat de un dispozitiv de numărare electronică.

Tehnica dă rezultate rapide și foarte exacte, deși este mai greu adaptabilă microorganismelor foarte mici, cum sînt bacteriile. Are dezavantajul că nu deosebește celulele microbiene de diferite impurități și, ca urmare, necesită utilizarea de suspensii pure.

3) *Determinarea numărului de celule viabile* se efectuează prin tehnici diferite (dispersia unei cantități cunoscute pe suprafața unui mediu solidificat sau încorporarea în mediu înainte de solidificare), pornind de la principiul că, teoretic, fiecare colonie care se dezvoltă după incubare, la o temperatură adecvată, are ca punct de plecare o singură celulă bacteriană.

Tehnica are o serie de avantaje, decurgînd din faptul că toate coloniile izolate pot fi folosite ca inoculum, pot fi studiate ca formă, dimensiuni, textură, culoare și pot fi numărate colonii aparținînd mai multor specii deodată.

Dezavantajele sînt legate de faptul că, în unele cazuri, coloniile izolate pot fi inițiate nu de o singură celulă, ci de agregate de celule și că rezultatele sînt influențate, uneori, de natura mediului de cultură (adesecori, numărul coloniilor este mai mare pe unele medii decît pe altele) și de durata perioadei de incubație (unele colonii se dezvoltă mai lent și durata incubației trebuie prelungită la 48 de ore). În cazurile în care numărul coloniilor dezvoltate pe o placă Petri este mai mare de 300, rezultatele sînt falsificate de faptul că unele colonii se suprapun și datorită densității mari și insuficienței anumitor nutrienți nu toate celulele viabile reușesc să formeze colonii. În cazul mediilor naturale cu un număr mic de bacterii (sub 100/ml) se recomandă concentrarea lor prin filtrarea unui volum cunoscut printr-o membrană sterilă, cu pori, care reține bacteriile, urmată de transferul membranei pe suprafața unui mediu de cultură solidificat.

CULTURILE SINCRONE

În cazul culturilor bacteriene obişnuite (însămînţarea unui mediu de cultură proaspăt, urmată de incubare), diviziunile celulelor individuale urmează ritmuri proprii, în aşa fel încît rezultă o populaţie eterogenă, formată din indivizi aflaţi, practic, în toate fazele ciclului lor de creştere şi multiplicare. Chiar în cazurile speciale, în care pornim de la o singură celulă, se constată că la descendenţii acesteia, după o perioadă de diviziune sincronă, apar diferenţe decurgînd din timpul diferit necesar celulelor progene să se dividă. Studiile efectuate pe astfel de culturi şi populaţii asincrone sînt utilizabile dacă se ţine cont de acest caracter de eterogenitate, recurgînd pentru diferitele aprecieri cantitative la valori medii. În unele cazuri speciale, cînd se studiază fenomene ca relaţia dintre sinteza unor macromolecule şi creşterea celulară, creşterea membranei şi a peretelui celular, organizarea şi diferenţierea celulară, rata de inducere a sintezei enzimelor, replicarea cromosomilor etc. eterogenitatea culturilor asincrone reprezintă un inconvenient important în interpretarea rezultatelor.

Culturile cu creştere sincronă, cu ajutorul cărora se încearcă să se ocolească aceste inconveniente, deşi au fost selecţionate din culturi asincrone, conţin organisme foarte asemănătoare, deoarece aparţin aceleiaşi categorii de vîrstă şi/sau de dimensiune şi, ca urmare, se divid aproape simultan. Procesul de diviziune sincronă durează numai cîteva generaţii (uneori numai 2—3), deoarece diferenţele individuale determină procese de defazare în ritmul de creştere, chiar între descendenţii unei singure celule (fig. 213).

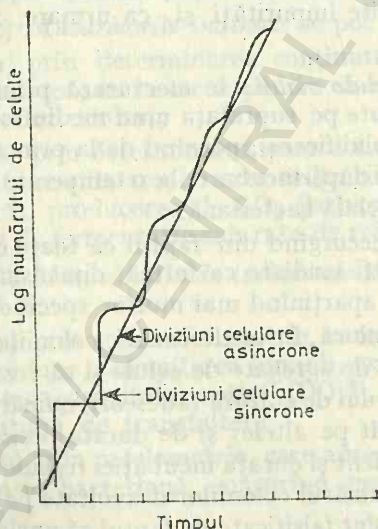


Fig. 213. — Creşterea sincronă şi asincronă („la întîmplare") a bacteriilor. În creşterea sincronă, majoritatea bacteriilor se divid aproape în acelaşi timp. În creşterea asincronă, diviziunile apar în diferite celule la intervale foarte variabile, deşi timpul necesar pentru ca fiecare celulă să se dividă este aproximativ acelaşi. Masa celulară urmează în ambele tipuri de creştere o evoluţie corespunzînd liniei drepte.

Diferitele tehnici propuse pentru obţinerea de culturi sincrone pot fi grupate în două categorii:

A. **Tehnicile bazate pe selecţie după dimensiuni de vîrstă** ţin seama de modificările ciclice de mărime, care însoţesc ciclul de diviziune. Se aleg, de obicei, celulele cele mai mici dintr-o populaţie, pornind de la premisa că celulele „nou-născute" sînt cele mai mici. Sînt folosite în mai multe variante:

a) *Filtrarea printr-un teanc de hîrtii de filtru suprapuse* reține celulele mari, pe cale să se dividă, în straturile superioare, de unde pot fi recuperate, și le lasă să treacă pe cele mici, care sînt preluate, fie din lichidul filtrat, fie prin eluare, după anumite hîrtii din teanc.

b) *Separarea prin centrifugare* în gradienți de densitate nemetabolizabili de microorganismul studiat (sucroză sau dextran), deși se însoțește frecvent de plasmoliză. Această tehnică este aplicabilă mai ales la levuri, la care celulele mici — la începutul ciclului de diviziune — sedimentează mai lent și pot fi separate din stratul superficial al centrifugatului.

c) *Separarea prin filtrarea pe filtre de membrană* a unei culturi aflată în faza exponențială de creștere, urmată de recuperarea celulelor rezultate din prima diviziune a celulelor fixate stabil (Helmstetter, 1978). Tehnica se bazează pe principiul că în cursul filtrării unele celule sînt legate lax în porii filtrului și pot fi îndepărtate prin spălare, în timp ce altele rămîn legate stabil de structura filtrului — în pori — unde se divid, pentru ca apoi să se desprindă de celula-mamă, trecînd în filtrat, dacă filtrul este spălat în sens invers cu un mediu de cultură favorabil. Tehnica recuperează deci celulele „nou-născute" (provenite din diviziunea celulelor fixate puternic de filtru), care se vor divide apoi sincron, 2—3 generații.

B. **Tehnicile bazate pe modificări ale mediului** pot fi utilizate în numeroase variante: — expunerea microorganismelor auxotrofe la o perioadă de „înfometare", în medii fără un factor de creștere esențial, înainte de a fi trecute într-un mediu complet; — expunerea la doze subletale de radiații; — expunerea la acțiunea unui antibiotic care inhibă sinteza proteinelor (cloramfenicol); — expunerea microorganismelor fotosintetizante alternativ la întuneric și lumină ; — expunerea alternativă unică sau repetată la temperaturi optimale și supra- sau suboptimale pentru creștere (fig. 214).

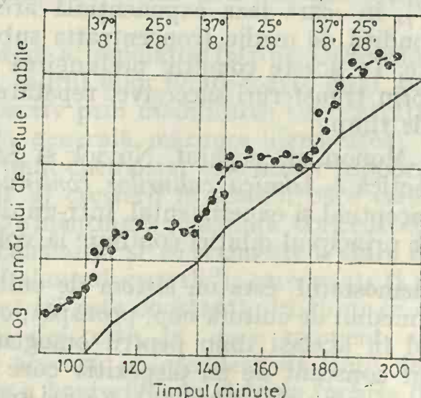


Fig. 214. — Sincronizarea unei culturi de *Salmonella typhimurium* prin alternanța incubării la 25°C (28 min) și la 37°C (8 min). Curba discontinuă reprezintă numărul de bacterii viabile determinat prin numărarea coloniilor. Intervalul dintre liniile orizontale corespunde unei dublări a populației bacteriene. Curba continuă reprezintă densitatea optică bacteriană (după Maaløe și Lark, 1954).

Mecanismul acțiunii acestor factori este necunoscut. Probabil că, factorul de mediu modificat sincronizează sinteza unuia sau mai multor compuși, care declanșează procesul de diviziune celulară, atunci cînd ajung într-o anumită concentrație în celulă. Influența expunerii la temperaturi scăzute pornește de la faptul că în ciclul de diviziune celulară ar exista o etapă în mod special

sensibilă la temperatură şi că prin aceasta creşterea celulelor ar fi oprită la acel punct din ciclul de diviziune, care dă posibilitatea membrilor cei mai „întîrziaţi" („leneşi") ai populaţiei să-i ajungă din urmă pe cei care au ajuns deja la acel punct. Expunerea bruscă la temperatura optimă suprimă bariera efectuării primei diviziuni şi, virtual, întreaga populaţie bacteriană începe să se dividă sincron. Metoda este destul de dificilă, deoarece temperatura necesară pentru creşterea sincronă trebuie determinată empiric pentru fiecare organism în parte. În plus, frecvent este necesar ca expunerile la modificările de mediu să fie repetate de mai multe ori, deoarece oprirea în stadiul de diviziune sensibil la temperatură nu este totdeauna eficientă (Stanier, 1974).

În funcţie de natura tehnicilor utilizate, Rowbury (1972) deosebeşte două categorii distincte de culturi: 1) *culturile sincrone*, în care toate bacteriile se divid în acelaşi timp, deoarece de la început au fost selecţionate celule cu vîrstă şi dimensiuni asemănătoare şi care nu au fost perturbate profund de tehnica utilizată pentru selecţie şi 2) *culturi sincronizate* , care au fost aduse în acelaşi stadiu de diviziune, de regulă prin tratamente fizice sau chimice, care au întîrziat diviziunea anumitor celule. În acest caz, relaţia diviziunii cu alte evenimente celulare este profund tulburată, ca urmare, rezultatele obţinute cu un astfel de sistem trebuie interpretate cu precauţie. Studiul culturilor sincronizate a permis cunoaşterea mai aprofundată a ciclului de diviziune la bacterii, evoluţia numărului de celule, corelaţia cu sinteza enzimelor şi a ADN.

CULTURILE CONTINUE

Anumite procese experimentale de laborator sau de producţie industrială necesită existenţa unor bacterii în faza exponenţială de creştere, ceea ce nu se poate realiza timp îndelungat în condiţiile obişnuite de cultivare, într-un spaţiu închis, respectiv într-un volum fix de mediu, nereînnoit („batch culture"), în care faza exponenţială are un număr limitat de generaţii şi unele condiţii de mediu (concentraţia substanţelor nutritive sau a O_2) devin limitante. În aceste condiţii, prelungirea fazei exponenţiale se poate realiza numai prin transferuri succesive, repetate, în medii optime noi, la intervale scurte de timp.

J. Monod şi, separat, Novick şi Szilard (1950) au introdus o metodă mai practică — *tehnica culturilor continue* — cu o importanţă deosebită pe plan conceptual şi experimental, într-un dispozitiv numit *chemostat* (*bactogen*), bazat pe principiul diluţiei continue la volum constant.

Chemostatul este un sistem de cultivare deschis, continuu, în care se adaugă mediul de cultură nou, proaspăt, cu o rată definită şi constantă, amestecîndu-l în acelaşi timp pentru omogenizare maximă. Volumul total este menţinut constant de un dispozitiv care permite recoltarea, cu aceeaşi rată (printr-un „sifon de preaplin"), a unei părţi din mediul de cultură, care conţine microorganismele multiplicate (fig. 215). Mecanismul face dintr-un nutrient esenţial (sursă de C, N sau factor de creştere) un factor limitant, în timp ce alţi nutrienţi sînt în exces. Mediul proaspăt, cu o cantitate limitantă de nutrient esenţial, este pompat în cultură, în mod continuu, în timp ce o cantitate egală, reprezentînd surplusul de microorganisme şi de mediu, părăseşte vasul pentru ca volumul să rămînă constant.

Spre deosebire de cultura în sistem închis, în care pe măsură ce organismul crește, concentrația substratului scade și, ca urmare, scade și rata de creștere, în chemostat, adăugarea continuă de mediu proaspăt fixează concentrația substratului și rata de creștere la o anumită valoare predeterminată. În mod obișnuit, în chemostate, nivelul de creștere nu este niciodată maximal,

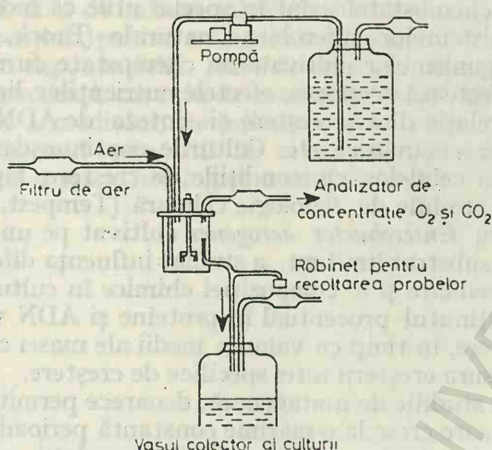


Fig. 215. — Schema unui chemostat simplu pentru cultivarea continuă a bacteriilor (după Rose, 1976).

ci este menținut la o valoare submaximală, prin menținerea unei concentrații limitante fixe a unui anumit nutrient esențial din mediu, care este ajustat la un nivel inferior celui necesar pentru a asigura creșterea maximală într-o cultură în sistem închis. Concentrația nutrientului limitant în chemostat este determinată, la rîndul său, de rata de diluție a mediului de cultură, respectiv de raportul dintre cantitatea de mediu nutritiv nou adăugat într-o oră față de volumul de mediu de cultură.

În felul acesta, rata de creștere a populației într-un chemostat poate fi variată și adaptată după voie în cadrul unor limite foarte largi, prin simpla modificare a ratei de diluție, respectiv prin modificarea concentrației anumitor nutrienți în mediu. Ca regulă generală, mărimea (densitatea) populației bacteriene în vasul de creștere al unui chemostat este direct proporțională cu concentrația nutrientului limitant al creșterii în mediul care este adăugat. În cazurile în care rata de diluție este menținută constantă, concentrația tuturor componenților din mediu devine constantă și se stabilește o stare de creștere echilibrată (,,steady-state" sau ,,balanced growth"), care poate fi menținută mult timp. În cursul ei, rata creșterii este constantă, în timp ce densitatea populației, nici nu crește, nici nu descrește, în orice moment al funcționării dispozitivului situația fiind aceeași, independent de timp, în contrast cu dinamica creșterii exponențiale a bacteriilor în sisteme închise (fără reîmprospătarea mediului). Prin acest mecanism, chemostatul furnizează în mod continuu o cultură care crește teoretic indefinit, cu viteza constantă, în condiții constante, furnizînd celule cu proprietăți uniforme și activități fiziologice optime. El se comportă ca un sistem autoreglat, în care ritmul de creștere se ajustează automat la valoarea de echilibru și va rămîne ca atare indefinit dacă condițiile respective sînt păstrate constante. Chemostatul permite controlul

atît al densităţii populaţiei bacteriene, cît şi al ratei specifice de creştere (μ) prin intermediul a doi factori de reglare: rata de diluţie şi concentraţia unui nutrient limitant.

Aplicaţii practice. Chemostatul este utilizabil în cazurile în care se urmăreşte o aprovizionare cu celule cu o rată de creştere joasă. Deoarece populaţiile naturale cresc lent şi adeseori în lacuri, rîuri, oceane etc. în prezenţa unor concentraţii scăzute de nutrienţi, chemostatele sînt în special utile ca modele de laborator pentru studiul ecosistemelor microbiene naturale (Brock, 1974). De asemenea, studiul microorganismelor cultivate în chemostate furnizează date privind parametrii care afectează creşterea, efectele nutrienţilor limitanţi asupra sistemelor enzimatice, relaţia dintre creştere şi sinteza de ADN, ARN şi proteine, controlul sintezelor enzimatice etc. Culturile continue dau posibilitatea de a corela compoziţia celulelor cu condiţiile de creştere, fapt care le conferă un rol important în studiile de fiziologie celulară (Tempest, 1969).

Herbert (1967), lucrînd cu *Enterobacter aerogenes* cultivat pe un mediu mineral cu glicerol sau NH_4^+ ca substrat limitant, a studiat influenţa diferitelor rate de creştere asupra masei celulare şi a compoziţiei chimice în culturi continue. El a demonstrat că, conţinutul procentual în proteine şi ADN variază puţin în raport cu rata de creştere, în timp ce valorile medii ale masei celulare şi ale ARN cresc marcat pe măsura creşterii ratei specifice de creştere.

Metoda este utilizabilă în studiile de mutageneză, deoarece permite menţinerea populaţiilor bacteriene care cresc la o mărime constantă perioade lungi de timp. Se foloseşte în industrie , pentru selecţia, fie din populaţii naturale, fie din culturi de laborator a tulpinilor capabile să realizeze anumite procese specifice, deoarece tulpina cel mai bine adaptată la condiţiile realizate în chemostat trebuie să depăşească în creştere, în cele din urmă, prin selecţie, alte tulpini şi devine dominantă în cultură.

Un tip special de dispozitiv de cultură continuă este **turbidostatul**, realizat de Northrop (1954), care reglează rata diluţiei în funcţie de densitatea microorganismelor (fig. 216). Procesul este controlat de o celulă fotoelectrică,

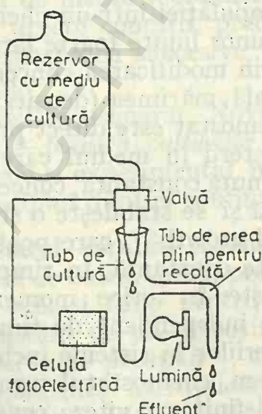


Fig. 216. — Schema unui turbidostat pentru cultura continuă a bacteriilor (după Brock, 1964).

ce înregistrează în mod continuu densitatea optică a culturii şi care, acţionînd printr-un semnal electric asupra unei valve, comandă aportul de mediu nou. În felul acesta, cînd densitatea optică depăşeşte limitele stabilite pentru

un anumit experiment, cantitatea de mediu de cultură nou adăugată crește și, invers, scade cînd densitatea optică a culturii diminuă. În aceste condiții, densitatea optică a culturii oscilează în jurul valorii fixate, cu mici oscilații legate de inerția aparatului. Dispozitivul poate fi ajustat pentru a menține practic indefinit orice grad de turbiditate, adăugarea mediului proaspăt făcîndu-se mai rapid cînd se urmărește o turbiditate mai mică sau, mai rar, cînd turbiditatea necesară este mai mare.

Mediile de cultură folosite în turbidostate conțin în exces toți nutrienții esențiali, pentru a asigura creșterea bacteriilor într-un ritm similar celui din faza exponențială. Rata de creștere este controlată de factori încă insuficient cunoscuți, care țin de condițiile interne ale sistemului (specie, compoziția chimică a mediului, factori de mediu etc.).

Sistemul este util în microbiologia industrială, deoarece furnizează celule cu o stare fiziologică asemănătoare.

MOARTEA MICROORGANISMELOR

Faza de declin și moarte a bacteriilor și a altor microorganisme este cel mai puțin studiată. Scoțînd în evidență faptul că moartea microorganismelor are un caracter diferit de cea a macroorganismelor, Postgate (1976) recunoaște că termenul „moarte" prezintă aceleași probleme semantice ca și termenul „viață". Neputînd fi definite în mod explicit, există necesitatea unui anumit acord în utilizarea lor, pentru a nu ne încurca în jocuri de cuvinte. Moartea unui organism complex, diferențiat, este, în mod normal, un fenomen foarte evident. De regulă, ea precede moartea celulelor componente și este rezultatul pierderii unor interacțiuni eficiente între celulele organismului. După un interval de timp însă, celulele componente mor și ele, probabil din motive similare. Dovada o constituie faptul că unele țesuturi și organe pot fi folosite pentru transplante în cadrul perioadei de timp de la recoltare în care își păstrează viabilitatea.

În anumite condiții, celulele organismelor superioare se comportă, într-o anumită măsură, asemănător populațiilor de microorganisme în laborator, respectiv pot fi cultivate, dar, spre deosebire de acestea, numai o perioadă limitată de timp dacă nu suferă o transformare malignă (Hayflick, 1965) (vezi vol. I, p. 87).

Lucrurile se petrec ca și cum diferențierea organismelor superioare a avut drept consecință „angajarea" spre moarte a celulelor somatice normale și faptul că, la modul cel mai general (cu excepția capacității de regenerare a plantelor, animalelor inferioare și a cazului particular al transplantelor), macroorganismele și componenții lor ar fi intrinsec muritori, în sensul că moartea este o parte inevitabilă a biologiei lor.

Moartea microorganismelor nu poate fi detectată decît retrospectiv, în primul rînd prin incapacitatea de a da naștere unei culturi sau unei colonii după însămînțare în medii de cultură corespunzătoare și incubare.

Termenul de *viabilitate*, aplicat în mod obișnuit numai la populații, exprimă raportul dintre numărul microorganismelor moarte și numărul total al microorganismelor dintr-o populație, Noțiunea de *viabil* este utilizată referitor la microorganisme fie în sensul „totul sau nimic" (un microorganism este „viabil" sau „mort"), fie în sens relativ: o clonă este mai viabilă decît alta (mai activă metabolic, capabilă de multiplicare mai rapidă și mai masivă, mai rezistentă la stress). Pentru ultima accepțiune, Postgate (1976) propune înlocuirea termenului *„viabil"* cu cel de *„viguros"* sau de *„vitalitate"* ca omonime lipsite de echivoc.

MOARTEA BACTERIILOR CARE ÎNMUGURESC

Fenomenele de îmbătrînire și moarte la bacteriile care înmuguresc îmbracă aspecte cu caracter particular. După cum am arătat mai înainte, *Caulobacter* are un ciclu de evoluție bifazică: celula-mamă pedunculată formează prin înmugurire o celulă mobilă juvenilă („roitor"), care, la rîndul său, devine pedunculată, potențial capabilă să producă noi muguri și noi roitori (fig. 201). Cu fiecare proces de înmugurire, celula-mamă adaugă o bandă transversală în structura pedunculului, în așa fel încît vîrsta ei poate fi apreciată după numărul benzilor transversale ale pedunculului (Staley și Jordan, 1973; Dow și Whittenbury, 1975).

Deși, în mod evident există posibilități de senescență, care duc la o moarte „naturală" , Postgate (1976) consideră că în prezent nu există probe care să se opună ideii că celulele-mamă sînt „nemuritoare". Atît la *Caulobacter*, cît și la *Rhodopseudomonas palustris* nu există nici o restricție asupra multiplicării formelor bătrîne și a numărului de celule-fiice pe care le pot forma, respectiv asupra numărului de benzi transversale. Un caz particular este reprezentat de *Rhodomicrobium vannielii*, care în faza de ramificare înmugurește succesiv, dar nu mai mult de patru ori. Ca urmare, o celulă parentală cu patru cicatrice este senescentă și, probabil, angajată spre moarte (Postgate, 1976).

MOARTEA MICROORGANISMELOR „DIVIZIBILE"

Bacteriile, ca și levurile care se înmulțesc prin diviziune simplă, produc descendenți ce nu sînt în relație de celulă-mamă — celulă-fiică, ci mai degrabă de celule-surori, deoarece ele au o vîrstă și o tinerețe egale. Cu excepția materialului genetic, care este reprezentat în fiecare celulă de o catenă cromosomală „nouă" și una „veche" — datorită replicării semiconservative a ADN (Meselson și Stahl, 1968), este probabil că restul materialelor „vechi" și „noi" sînt repartizate la întîmplare la descendenți.

Modul de creștere al peretelui celular și, probabil, și al altor structuri demonstrează că anumite porțiuni ale acestora pot fi mult mai vechi decît celulele care le poartă. În principiu însă, celulele rezultate din diviziunea simplă nu diferă semnificativ ca vîrstă nici la nivel molecular.

În concluzie, microorganismele care se divid nu ajung bătrîne și nu mor, ci dispar: celula parentală este înlocuită de două celule deopotrivă de tinere. Ele mor dacă sînt lăsate să se învechească în culturi sau dacă anumiți factori din mediu (fizici, chimici sau biologici) opresc multiplicarea. În cazul bacteriilor, moartea este frecvent însoțită de liză, produsă de o categorie specifică de enzime, *autolizinele*.

Postgate și Hunter (1972), precum și Postgate (1976) au descris la bacterii o stare de *pseudosenescență*, asemănătoare fenomenelor de îmbătrînire descrise la eucariote, în cursul căreia, în urma unor fenomene de stress, acestea își pierd capacitatea de a se multiplica, rămînînd complet funcționale ca indivizi. Spre exemplu, *Klebsiella pneumoniae*, expusă timp de 24 de ore la înfometare, are o viabilitate de numai 20%, deși peste 80% din populația bacteriană are funcția de barieră osmotică intactă, conține totalitatea aminoacizilor necesari și își păstrează capacitatea de a răspunde la modificările

osmotice blînde. La fel se comportă unele bacterii după îngheț și dezgheț. În multe cazuri, bacteriile incapabile de multiplicare sînt considerate, pentru motive de ordin practic, drept moarte cînd, în realitate, ar putea fi considerate cel mult „muribunde". Existența acestui fenomen ridică probleme legate de natura posibilă și reversibilitatea „pseudosenescenței" bacteriene și demonstrează, după Postgate (1976), că moartea și viața pot fi descrise și etichetate, dar nu definite.

SUPRAVIEȚUIREA ȘI MOARTEA BACTERIILOR

Pierderea viabilității microorganismelor poate fi rezultatul epuizării nutrienților din mediu, ocupării la limita extremă a spațiului biologic disponibil, acumulării unor produși toxici, unor condiții adverse de pH sau intervenției unor factori fizici sau chimici letali. În mod obișnuit, moartea bacteriilor survine ca rezultat al intervenției mai multor stressuri simultane. Cînd stressul este foarte mare (căldură, iradiere prelungită cu UV, radiații γ, dezinfecție etc.), este distrus întregul edificiu molecular (proteine, acizi nucleici, lipide etc.) a cărui integritate este esențială pentru viață. În cazurile în care stressul este mai blînd, arhitectura moleculară a celulei este numai parțial modificată, în acest caz devenind vizibile și influențele stressurilor adiționale.

Cele mai multe studii asupra supraviețuirii au fost făcute experimental asupra unor populații de bacterii supuse înfometării, prin suspendare într-un mediu tampon-nenutritiv. Rata supraviețuirii depinde de o serie de factori, între care, la unele bacterii, capacitatea ereditară de a rezista la înfometare, starea nutrițională a microorganismului etc. Spre exemplu, celulele de *E. aerogenes*, cultivate într-un mediu complex cu compoziție chimică nedefinită, supraviețuiesc mai mult decît cele obținute prin cultivare în condiții de creștere limitată de concentrația de manitol.

Moartea microorganimelor într-o populație este un fenomen statistic. Dacă se înscrie într-un grafic logaritmul numărului bacteriilor supraviețuitoare față de timp (fig. 217) se obține o curbă, numită *curba de supraviețuire*,

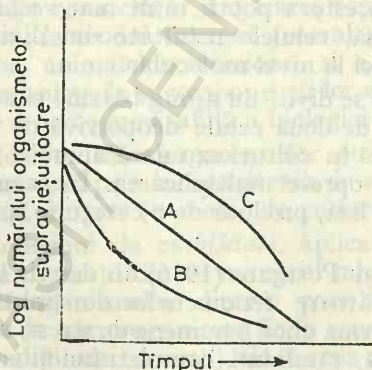


Fig. 217. — Diferitele curbe de supraviețuire observate la bacteria *Enterobacter aerogenes*.

care cel mai adesea este lineară, gradul său de înclinare reflectînd rata morții bacteriilor din populația respectivă. Curbele de supraviețuire exponențiale se întîlnesc mai ales după expunere la temperaturi ridicate, radiații ionizante,

dezinfectanţi etc. După Postgate (1976), acest comportament este tipic, probabil, numai pentru o minoritate din populaţia iniţială şi vizibil pentru un stress izolat şi suficient de puternic. Altfel, această curbă poate lua orice formă (sigmoidă, concavă etc.), în funcţie de natura şi multiplicitatea stressurilor la care populaţia a fost expusă. Spre exemplu, curba morţii bacteriei *Enterobacter aerogenes* obţinută prin culturi continue în medii cu concentraţii limitante de Mg^{2+}, urmată de transfer în tampon-nenutritiv, este exponenţială. Devierile de la curba exponenţială (curbele B şi C din fig. 217) au fost obţinute cu aceeaşi bacterie, cînd cultivarea s-a făcut în medii în care factorul limitant a fost reprezentat de nutrienţii care servesc ca sursă de N şi P.

În general, curbele exponenţiale caracterizează reacţiile unimoleculare, în timp ce curbele neexponenţiale sînt expresia intervenţiei unor reacţii bi- şi polimoleculare, în cursul omorîrii bacteriilor (Rose, 1976). În apariţia curbelor neexponenţiale a mai fost incriminată capacitatea diferită de rezistenţă a membrilor populaţiei respective la condiţiile de mediu, prezenţa unor microorganisme grupate (ca la stafilococ), în care caz dispariţia capacităţii de a iniţia formarea unei colonii implică moartea tuturor celulelor prezente în gruparea respectivă.

Chapman, Fall şi Atkinson (1971) au demonstrat la *Escherichia coli* existenţa unei corelaţii între viabilitate şi cantitatea de energie prezentă în celule, exprimată sub forma *„încărcăturii cu adenilat"* *). În faza de creştere, valoarea acesteia este de 0,8, iar în faza staţionară şi de înfometare scade la început lent la ~ 0,5, cu păstrarea viabilităţii tuturor celulelor, după care urmează o scădere bruscă, însoţită de diminuarea brutală a viabilităţii, exprimată prin incapacitatea bacteriilor de a iniţia subculturi. Datele sugerează „încărcătura energetică" cu valoarea de ~ 0,5 ca o limită a viabilităţii, valorile inferioare fiind incompatibile cu viaţa *E. coli*.

Moartea celulelor bacteriene este însoţită de o degradare rapidă a ARN celular, cu eliberarea constituenţilor săi. Degradarea proteinelor intracelulare începe după o perioadă de latenţă, în timp ce polizaharidele şi ADN sînt cele mai rezistente. Deşi conţinutul în ADN nu este alterat semnificativ în cursul înfometării şi al pierderii viabilităţii ce o însoţeşte, este probabil că structura acestuia suferă modificări într-un mod care poate predispune la moarte. Se adaugă modificările în conformaţia şi funcţia diferitelor macromolecule (în special enzimatice), care slăbesc structura şi organizarea celulară (Dawes, 1976).

Influenţa densităţii populaţiei. Harrison (1960) a descris influenţa densităţii populaţiei („efectul populaţional") asupra populaţiilor bacteriene expuse înfometării. Fenomenul a fost ulterior confirmat în cazul bacteriei *Enterobacter aerogenes* expusă la şoc termic (temperaturi ridicate sau frig) şi la îngheţ—dez-

---

*) „Încărcătura cu adenilat" („adenylate charge") sau „încărcătura energetică" („energy charge") reprezintă o valoare propusă de Atkinson (1969, 1971) pentru a exprima convenţional conţinutul în energie al unui microorganism (considerat ca un acumulator). Ea reflectă gradul în care sistemul ATP—ADP—AMP este „încărcat" cu legături ~ P. Se calculează după formula:

$$IC(IE) = \frac{0,5\,[ADP] + 2\,[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

Valorile pentru microorganisme sînt cuprinse între 0,1 şi 1,0.

gheţ. Populaţiile bacteriene dense sînt omorîte în grad mult mai mic decît cele sărace şi aceasta datorită faptului că rata *specifică* a morţii populaţiilor dense este mai mică decît a celor sărace (nu faptului că în populaţiile rare sînt mai puţini indivizi care mor). Efectul populaţiei poate fi determinat, cel puţin parţial, de creşterea criptică ce apare cînd nutrienţii eliberaţi din organismele moarte sînt utilizaţi de supravieţuitori. El mai poate fi realizat datorită efectului protector al substanţelor eliberate din celulele moarte faţă de cele învecinate supravieţuitoare sau faptului că populaţiile care depăşesc un anumit prag de densitate pot neutraliza mai uşor anumite substanţe toxice.

Creşterea criptică. Pierderea viabilităţii celulelor bacteriene este urmată, datorită permeabilităţii crescute a învelişurilor celulare şi fenomenelor de liză, de eliminarea în mediu a numeroase substanţe provenind din degradarea, în special, a proteinelor şi a acizilor nucleici, care pot fi reutilizate şi metabolizate de bacteriile supravieţuitoare ce se pot multiplica (fig. 218). Fenomenul

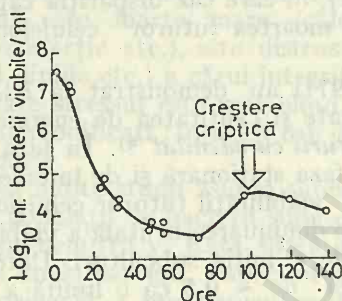


Fig. 218. — Dinamica curbei de supravieţuire a bacteriei *Enterobacter aerogenes*, cu evidenţierea unei faze de „creştere criptică" (după Postgate şi Hunter, 1962).

a fost numit, iniţial, de Ryan (1959) „creştere criptică" şi, ulterior, „turnover celular", „reluarea creşterii" („regrowth") sau „canibalism". Studiind creşterea criptică la *Enterobacter aerogenes*, Postgate şi Hunter (1962) au demonstrat că formarea unei noi bacterii (prin diviziunea unui supravieţuitor) în mediu tampon-nenutritiv necesită utilizarea substanţelor provenite din ~ 50 de celule bacteriene moarte prin înfometare.

ÎMBĂTRÎNIREA ŞI MOARTEA MICROORGANISMELOR EUCARIOTE

Îmbătrînirea organismelor eucariote este rezultatul unui proces endogen, care are loc mai mult sau mai puţin independent de condiţiile exogene. Cele mai multe date în acest sens au fost obţinute iniţial din studiul culturilor de celule provenite de la mamifere (vezi vol. I, p. 80). Astfel, celulele diploide ale mamiferelor prezintă în culturi un număr limitat de diviziuni (~ 40—60) înainte de îmbătrînire şi moarte (Hayflick şi Morehead, 1971). Îmbătrînirea fibroblaştilor diploizi umani în culturi poate fi corelată cu vîrsta întregului organism (Holliday, 1972), deoarece numărul diviziunilor în culturile de celule este mai redus, pe măsură ce vîrsta indivizilor de la care au fost izolaţi creşte (Martin, Sprague şi Epstein, 1970). Fenomene similare se întîlnesc în cazul

unor microorganisme eucariote, care în culturi îmbătrînesc într-un mod — cel puțin aparent — independent de condițiile exogene. Durata vieții unui *Paramecium* variază între ~ 20 și 200 de generații succesive. Fenomenele de îmbătrînire ale unei clone sînt caracterizate prin creșterea duratei timpului de generație și a perioadei de sinteză a ADN (faza S a ciclului celular). Celulele vegetative ale clonei îmbătrînite reîntineresc în urma proceselor de autogamie sau de conjugare (Smith-Sonneborn, 1974).

Îmbătrînirea și moartea sînt, de asemenea, părți intrinsece ale ciclului biologic ale fiecărei celule individuale de *Saccharomyces cerevisiae*, care au o viață finită, corelată cu numărul de diviziuni suferite. Bartnicky-Gracia și McMurrough (1971) au demonstrat că formarea și desprinderea fiecărui „mugure" lasă o cicatrice indelebilă, în așa fel încît se poate aprecia vîrsta fiecărei celule, în funcție de numărul de diviziuni suferite, respectiv de numărul de cicatrice prezente pe suprafața levurii. Există restricții care împiedică formarea unor noi muguri pe locul unei cicatrice anterioare. Deși celulele de *S. cerevisiae* au, de regulă, o suprafață suficient de mare pentru a permite formarea a ~ 100 de muguri, niciodată nu fac mai mult de 20—30 (Cook, 1963). Creșterea numărului cicatricelor pe suprafața unei celule individuale marchează angajarea ei spre îmbătrînirea progresivă, însoțită de incapacitatea de a se multiplica și, final, spre moarte (Liebelova și colab., 1964).

Ca și la *Paramecium*, levurile pot fi reîntinerite în urma proceselor de conjugare, cînd ascosporii sînt eliberați după ruptura peretelui ascei. Spre deosebire de *Paramecium*, la care fenomenele de îmbătrînire apar ca rezultat al unei degradări treptate, la levuri acest proces pare să se instaleze brusc.

Unele mucegaiuri cenocitice suferă un proces de îmbătrînire numit *senescență clonală* sau *moarte vegetativă*, care apare ca o scădere bruscă a ratei de creștere radială a coloniei, însoțită de distorsiunea hifelor și, eventual, încetarea dezvoltării coloniei (Holliday, 1969). Fenomenul a fost studiat la *Aspergillus glaucus*, la care pare să aibă, mai degrabă, o origine citoplasmatică decît nucleară, fiind consecința unei degenerări rezultînd din lipsa de acuratețe funcțională a „mașinăriei" de sinteză a proteinelor în hifele îmbătrînite (Lewis și Holliday, 1970). Explicația este în acord cu ipoteza lui Orgel (1963), care consideră că în cursul fenomenelor de îmbătrînire erorile în secvența aminoacizilor încep să apară chiar la nivelul proteinelor cu funcții în transcrierea și traducerea genetică. În acest caz, rata apariției proteinelor defective sau nefuncționale crește mult, în așa fel încît întreaga „mașinărie" de sinteză a proteinelor devine nefuncțională și organismul moare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

ADAM, S.J.N., 1966, *Studies on the fragmentation of Nocardia erythropolis in liquid medium.* Canad. J. Microbiol., **12**, 433–443.

ADLER, H. I., FISCHER, W. D., HARDIGREE, A. A., 1969, *Cell division in Escherichia coli.* Proc. Nat. Acad. Sci. (S.U.A.), **59**, 321–327.

BEGG. K. J., DONACHIE, W. D., 1977, *Growth of the Escherichia coli cell surface.* J. Bacteriol., **129**, 1 524–1 536.

BREMER, H., CHUANG, L., 1981, *The cell cycle in Escherichia coli B/r,* J. Theor. et Biol., **88**, 47–81.

BROCK, T. D., 1974, *Biology of microorganisms.* Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

BROWN, O., CLARK, J. B., 1966, *Fragmentation in Nocardia corallina.* J. Gen. Microbiol., **45**, 525–531.

BURDETT, I.D.J., MURRAY, R. G.E., 1974, *Septal formation in Escherichia coli: Characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division.* J. Bacteriol., **119**, 303–324.

CLARK, D., MAALE, O., 1967, *DNA replication and the division cycle in Escherichia coli.* J. Molec. Biol., **23**, 99–106.

COHEN, G., 1976, *La croissance bacterienne.* În: *Microbiologie et biologie moléculaire,* Hermann, Paris, p. 13–27.

COLE, R. M., 1965, *Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts.* III *Bacterial cell-wall replication followed by immunofluorescence.* Bacteriol, Rev., **29**, 326–344.

COOPER, S., HELMSTETTER, C. E., 1968, *Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r,* J. Molec. Biol., **31**, 519–540.

DAVIS, B., DULBECCO, R., EISEN, H. N., GINSBERG, H. S., WOOD, W. B. Jr., 1973, *Microbiology,* ed a 2-a, Harper & Row Publ. Inc., Hagestown, Maryland.

DAWES, E.A., 1976, *Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes.* Symposium of the Society for „General Microbiology. XXVI. „The Survival of Vegetative Microbes". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 19–55.

DONACHIE, W. D., JONES, N. C., TEATHER, R., 1969, *The bacterial cell cycle.* Symposium of the Society for General Microbiology. XIX. „Microbial Growth", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 9–44.

DONACHIE, W. D., BEGG, K. J., 1970, *Growth of the bacterial cell.* Nature (London), **227**, 1 220– – 1 224.

EVANS, J. D. (ed.), 1977, *Biochemistry* and *molecular biology. Metabolism.* The Open University Press, Londra.

GOODWIN, B. C., 1969, *Growth dynamics and synchronization of cells.* Symposium of the Society for General Microbiology. XIX. „Microbial Growth", Londra, p. 223–236 Cambridge Univ. Press.

HARTWELL, L. H., 1974, *Saccharomyces cerevisiae cell cycle.* Bacteriol. Rev., **38**, 164–198.

HELMSTETTER, C. E., COOPER, S., PIERUCCI, O., REVELAS, E., 1968, *On the bacterial life sequence.* Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology, **33**, 809–822.

HELMSTETTER, C. E., 1969, *Sequence of bacterial reproduction.* Ann. Rev. Microbiol., **23**, 223–238.

HELMSTETTER, C. E., PIERUCCI, O., WEINBERGER, M., HOLMES, M., MOONSHONG, TANG, 1979, *Control of cell division in Escherichia coli.* În *The Bacteria,* vol. VII, SOKATCH, J.R., ORNSTON, L. N. (eds.), Acad. Press, New York.

HIGGINS, M. L., SHOCKMAN, G. D., 1970, *Model for cell wall growth of Streptococcus faecalis.* J. Bacteriol., **101**, 643—648.
HIGGINS, M. L., SHOCKMAN, G. D., 1971, *Procaryotes cell division with respect to wall and membrane.* Crit. Rev. Microbiol., **1**, 29—72.
HIGGINS, M. L., 1976, *Three-dimensional reconstruction of whole cells of Streptococcus faecalis from thin sections of cells.* J. Bacteriol., **127**, 1 337—1 345.
HIGGINS, M. L., SHOCKMAN, G. D., 1976, *Study of a cycle of cell wall assembly in Streptococcus faecalis by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells.* J. Bacteriol., **127**, 1 346—1 358.
HINSHELWOOD, C. N., 1951, *Decline and death of bacterial populations.* Nature, (London), **167**, 666—669.
HIRSCH, P., 1974, *Budding bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **28**, 392—444.
HOBSON, P. N., 1969, *Growth of mixed cultures and their biological control.* Symposium of the Society for General Microbiology. XIX. „Microbial Growth". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 43—64.
JOKLIK, W. K., WILLET, H. P., 1976, *Zinsser's Microbiology*, ed. a 16-a, Appleton Century Crofts, Prentice Hale Inc., New York.
JONES, N. C., DONACHIE, W. D., 1973, *Chromosome replication, transcription and control of cell division in Escherichia coli.* Nature (New Biology), **243**, 100—103.
KALAKOUTSKII, L. V., AGRE, N. S., 1976, *Comparative aspects of development and differention in Actinomycetes.* Bacteriol. Rev., **40**, 469—524.
KOCH, A.L., HIGGINS, M. L., DOYLE, R. J., 1981, *Surface tension-like forces determine bacterial shapes Streptococcus faecium.* J. Gen Microbiol., **123**, 151—161.
KOCH, A. L., HIGGINS, M. L., DOYLE, R. J., 1982, *The role of surface stress in the morphology of microbes.* J. Gen. Microbiol., **128**, 927—945.
KOCH, A. L., 1982, *The shape of the hyphal tips of fungi.* J. Gen. Microbiol., **128**, 947—951.
KOCH, A. L., 1982, *On the growth and form of Escherichia coli.* J. Gen. Microbiol., **128**, 951—955.
MALEK, I., RICICA, J., 1964, *Continuous cultivation of microorganisms.* Folia Microbiologica, **9**, 321—344.
MARR, A. G., PAINTER, P. R., NILSON, E. H., 1969, *Growth and division of individual bacteria.* Symposium of the Society for General Microbiology, XIX. „Microbial Growth", Cambridge Univ., Press, Londra , p. 237—261.
MARSHALL, K. C., ALEXANDER, M., 1960, *Growth haracteristics of fungi and Actinomycetes,* J. Bacteriol., **80**, 912—416.
MAZIA, D., 1974, *The cell cycle.* Sci. Amer., **230**, 55—64.
MONOD, J., 1942, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes,* Herman & Co., Paris.
MOORE, R. L., 1981, *The biology of Hyphomicrobium and other prosthecate budding bacteria.* Ann. Rev. Microbiol., **35**, 567—94.
NANNINGA, N., KOPPES, L. J. H., de VRIES-TIJSSEN, F. C., 1979, *The cell cycle of Bacillus subtilis as studies by electron microscopy.* Arch. Microbiol., **123**, 173—183.
NESTER, E. W., ROBERTS, C. E., 1973, *Microbiology, molecules, microbes and man,* Holt Rinchart & Winston Inc., New York.
PAINTER, P. R., MARR, A. G., 1968, *Mathematics of microbial populations.* Ann. Rev. Microbiol., **22**, 519—548.
PAYNE, W. J., WIEBE, W. J., 1978, *Growth yield and efficiency in chemosynthetic microorganisms.* Ann. Rev. Microbiol., **32**, 155—83.
PIRT, S. J., 1969, *Microbial growth and product formation.* Symposium of the Society for General Microbiology. XIX. „Microbial Growth", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 199—221.
POINDEXTER, J. S., 1981, *The Caulobacters: Ubiquitous unusual bacteria.* Microbiological Rev., **28**, 231—295.
POSTGATE, J. R., HUNTER, J. R., 1962, *The survival of starved bacteria.* J. Gen. Microbiol., **29**, 233—267.
POSTGATE, J. R., 1976, *Death in macrobes and microbes.* Symposium of the Society for General Microbiology. XXVI. „The Survival of Vegetative Microbes", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 1—19.
PREVIČ, E. P., 1970, *Biochemical determination of bacterial morphology and the geometry of cell division.* J. Theoret. Biol., **27**, 471—497.
ROGERS, H. J., 1970, *Bacterial growth and the cell envelope.* Bacteriol. Rev., **34**, 194—214.
ROGERS, H. J., 1974, *Peptidoglycans (mucopeptides): Structure, function and variations.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **235**, 29—51.
ROSE, A. H., 1976, *Chemical microbiology. An introduction to microbial physiology,* Plenum Press, New York.

ROWBURY, R. J., 1972, *Bacterial cell division: its regulation and relation to DNA synthesis.* Sci. Progr., Oxford, **60**, 169—188.
SHARPLES, G. P. WILLIAMS, S. T., BRADSHAW, R. M., 1974, *Spore formation in the Actinoplanaceae (Actinomycetales).* Arch. Microbiol., **101**, 9—21.
SHOCKMAN, G. D., DANEO-MOORE, L., HIGGINS, M. L., 1974, *Problems of cell wall and membrane growth enlargement and division.* Ann. N.Y. Acad. Sci., **235**, 161—197.
SLATER, M., SCHAECHTER, M., 1974, *Control of cell division in bacteria.* Bacteriol. Rev., **38**, 199—221.
SOKATCH, J. R., FERRETTI, J. J., 1976, *Basic bacteriology and genetics,* Year Book Medical Publ. Inc., Chicago.
STALEY, J. T., JORDAN, T. L., 1973, *Crossbands of Caulobacter crescentus stalks serve as indication of cell age.* Nature (London), **246**, 155—156.
STARR, M. P., STOLP, H., TRÖPER, H. G., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. (eds.), 1981, *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria,* vol. I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
STEED, P., MURRAY, R.G.E., 1966, *The cell wall and cell division of Gram-negative bacteria.* Canad. J. Microbiol., **12**, 263—270.
WEIDE, H., AURICH, H., 1979, *Allgemeine Mikrobiologie,* Gustav Fischer Verlag, Jena.
ZARNEA, G., 1980, *Bioinginerie preparatelor enzimatice microbiene,* Edit. tehnică, Bucureşti.
ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală,* Edit. didactică şi pedagogică. Bucureşti.

PRINCIPII DE SISTEMATICĂ ȘI TAXONOMIE A MICROORGANISMELOR

„Sistematica este una dintre ramurile cele mai importante și indispensabile, dintre cele mai captivante și mai pline de satisfacții ale științelor biologice. Nu cunosc nici un alt subiect care să ne învețe mai multe despre lumea în care trăim decît sistematica, studiul diversității vieții".

ERNST MAYR

PRINCIPII DE SISTEMATICĂ ȘI TAXONOMIE A MICROORGANISMELOR

Ca și în alte domenii ale biologiei, curînd după descrierea unui număr mai mare de microorganisme, cercetătorii din domeniul microbiologiei au simțit nevoia organizării și sistematizării materialului acumulat.

Reunite inițial sub denumirea de „animalcule" (Leeuwenhoek, 1697) și grupate apoi în grupul „Chaos" de Linné în secolul al XVIII-lea, microorganismele au fost pentru prima oară clasificate într-un sistem ordonat de către Otto Müller în anii 1773 și 1786. Ulterior, pentru clasificarea bacteriilor au fost elaborate cîteva sisteme care aveau ca unitate de bază specia și erau alcătuite numai pe criterii mofologice (F. Cohn, 1872), caractere de cultură și unele proprietăți fiziologice (Migula, 1897) sau exclusiv după proprietățile fiziologice ale speciilor (Orla Jensen, 1909).

Taxonomia este o știință în permanentă dinamică, fiind obligată să realizeze o sinteză, mereu actualizată, a tuturor cunoștințelor achiziționate în biologie, pe baza cărora să poată exprima în puține cuvinte definiția speciilor ca organisme grupate după relațiile lor filogenetice. Ea reprezintă pentru specialiști un instrument practic de excepțională importanță, deoarece le pune la îndemînă un îndreptar pentru identificarea organismelor studiate.

Studiul plantelor și al animalelor superioare a arătat că ele pot fi clasate în mai multe tipuri biologice distincte, definite printr-un număr mare de caractere comune, care sînt ușor de determinat deoarece organismele grupate pe baza lor aparțin unei ramuri unice de evoluție și, ca atare, au o mai mare înrudire genetică între ele decît cu alte organisme construite după un model diferit. Recunoașterea acestui fapt a determinat o tendință firească de a grupa organismele, în general, într-un mod care să exprime cel mai bine gradul lor de înrudire stabilit în cursul evoluției. Clasificări bazate pe acest principiu — numite clasificări naturale sau filogenetice — au apărut încă de la începutul secolului al XVIII-lea sub influența ideilor lui Aristotel. Dezvoltate de Linné, acest tip de clasificări s-a înmulțit și perfecționat după ce valabilitatea teoriei filogenetice a evoluției propusă de Darwin a fost recunoscută.

Ele pornesc de la premisa că în natură există o ordine care poate fi descoperită printr-o cercetare atentă, capabilă să dezvăluie interrelațiile filogenetice existente în lumea vie. Dacă pentru organismele superioare identificarea relațiilor de înrudire între specii este în general ușoară, dificultățile de investigare în această direcție cresc progresiv, pe măsura abordării unor organisme tot mai puțin complexe, pentru ca la bacterii determinismul filogenetic al grupării naturale să devină practic insesizabil. Datele foarte sumare furnizate de studiul fosilelor bacteriene nu permit elaborarea unui sistem

natural, filogenetic, de clasificare a bacteriilor, sistem care să le pună în evidență direcțiile de evoluție. De aceea, taxonomia bacteriană urmărește, mai curînd, o clasificare convențională a acestor microorganisme, prin care să se realizeze gruparea lor în așa fel încît organismele să fie încadrate în diviziunile sistematice, în funcție de asemănările lor, trecîndu-se cu vederea caracterele necomparabile sau discordante. Clasificările bazate pe acest principiu urmăresc, pe lîngă satisfacerea unui scop utilitar, și realizarea unei ordonări cît mai logice a organismelor în cadrul sistemului, cu toate că în realitate ele sînt în mare măsură — și în mod inevitabil — arbitrare și subiective, deoarece rezultă din cercetarea numai a anumitor caractere alese, cu ignorarea deliberată a tuturor celorlalte.

Spre deosebire de clasificarea ideală, care este în mod obligatoriu unică, întrucît reflectă ierarhia filogenetică reală, clasificările convenționale pe bază de asemănare pot fi numeroase, întrucît exprimă puncte de vedere diferite relativ la selecția caracterelor definitorii, selecție care, oricum, rămîne subiectivă și mai mult sau mai puțin arbitrară.

Taxonomia bacteriilor se lovește în practică de dificultăți mari, care se datoresc, în primul rînd, faptului că microbiologul, spre deosebire de alți biologi, este nevoit să studieze aceste microorganisme nu ca indivizi, ci ca populații și, în plus, nu în mediul lor natural, ci izolate de acesta, în condiții artificiale de laborator. Întrucît în laborator nu se pot reproduce niciodată întocmai condițiile naturale de trai ale bacteriilor, caracterele fenotipice ale acestora se pot modifica în anumite limite fixate de genotip, deoarece genotipul — care este stabil — poate avea diferite expresii fenotipice în funcție de natura mediului. Pentru acest motiv și, mai ales, pentru că variabilitatea sub influența condițiilor de mediu se produce foarte rapid la microorganisme, în aprecierea caracterelor acestora trebuie să se țină seama de faptul că studiul în condiții de laborator nu permite evidențierea fenotipului natural al microorganismului dat, ci numai observarea fenotipului corespunzător situației artificiale în care acesta este pus. Pentru a se preîntîmpina erorile care decurg dintr-o asemenea situație, este necesar ca studiul tulpinilor microbiene să fie făcut cît mai curînd după izolarea lor din mediul natural și pe un mediu de cultură cît mai apropiat de cel natural, iar rezultatele obținute trebuie raportate la condițiile de lucru respective.

TERMINOLOGIE

Termenii de clasificare, sistematică și taxonomie sînt folosiți foarte adesea ca avînd aceeași semnificație sau cu accepțiuni diferite de la un autor la altul.

Simpson (1961) îi separă, acordîndu-le următoarele semnificații:

Sistematica reprezintă studiul științific al diferitelor categorii de organisme, al diversității lor și al relațiilor dintre ele. În sensul său cel mai larg, ea implică nu numai caracterizarea și aranjarea organismelor în taxoni și denumirea lor, ci și cauzele și originile acestor aranjamente.

Clasificarea reprezintă aranjarea ordonată a organismelor în grupuri, pe baza relațiilor dintre ele.

Taxonomia este studiul teoretic al clasificării, incluzînd bazele ei, principiile, procedeele și regulile.

Pentru Cowan (1965), sistematica este studiul unui număr de unități sau indivizi, cu scopul de a găsi factorii comuni și diferențele specifice. Liniile de separație între ele sînt trasate în așa fel încît entitățile asemănătoare se regăsesc de o parte a liniei, iar cele diferite de partea cealaltă.

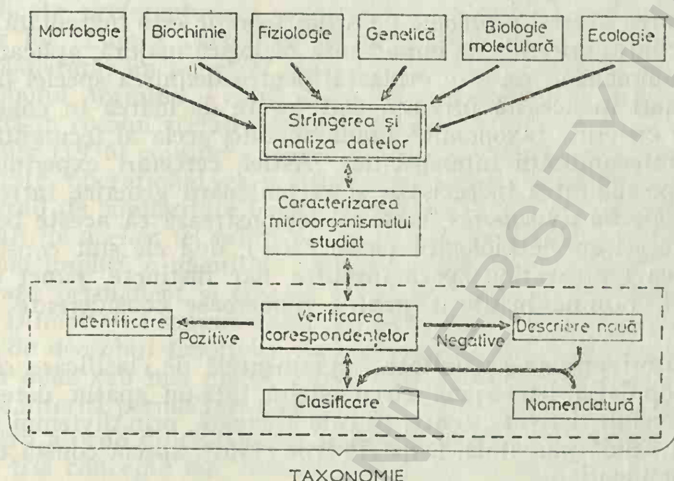


Fig. 219. — Diagrama fluxului de informație, evidențiind relațiile dintre caracterizarea și taxonomia unei tulpini bacteriene (după Trüper și Krämer, 1981).

După Cowan, sistematica biologică poartă numele special de taxonomie (gr. taxis = aranjare; nomos = lege, regulă) și are drept scop gruparea ordonată și clasificarea diferitelor specii de microorganisme, plante și animale după interrelațiile lor naturale, urmărind, în același timp, și stabilirea unei nomenclaturi corecte. Ea însumează trei domenii de preocupare independente: a) *clasificarea*, aranjarea ordonată a indivizilor sau unităților de bază în grupuri de unități mai mari, adică sortarea indivizilor respectivi în asemănători și neasemănători, pe baza proprietăților lor similare. Termenul definește și produsul final al clasificării: „rezultatul clasificării este o clasificare sau, mai corect spus, un sistem de clasificare" (Jardine, 1971); b) *nomenclatura*, denumirea corectă a unităților definite și delimitate prin clasificare și c) *identificarea* unităților adiționale, prin compararea celor necunoscute cu cele cunoscute, și repartizarea lor în clasa corectă, corespunzătoare (fig. 219).

CONCEPTUL DE SPECIE BACTERIANĂ

Una dintre dificultățile majore care grevează studiile de sistematică bacteriană constă în faptul că, în ceea ce privește bacteriile, noțiunea de *specie* nu este încă bine precizată sub raportul extinderii sau limitelor ei.

Datorită acestui fapt, concepțiile autorilor moderni variază de la considerarea speciei bacteriene ca o unitate fundamentală de ordin biologic, nu numai sistematic, pînă la negarea semnificației ei biologice, contrastînd cu recunoașterea acestei semnificații în cazul speciilor vegetale și animale, deci pînă la evaluarea noțiunii de specie bacteriană ca arbitrară, subiectivă și lipsită de conținut real, admisibilă doar în virtutea utilității ei taxonomice (Lwoff, 1968; Cowan, 1975 etc.).

Rezolvarea acestei probleme de ordin teoretic este îngreuiată de faptul că nici unul dintre criteriile de importanță biologică majoră, aplicate în cazul plantelor și animalelor, nu este utilizabil pentru definirea speciei bacteriene. Dificultăți mari în această privință sînt legate de luarea în considerare a unuia dintre criteriile taxonomice fundamentale, acela al fecundității intraspecifice și infecundității interspecifice. Astfel, cercetări experimentale au demonstrat posibilitatea încrucișării și recombinării genetice între *Escherichia coli* și *Shigella dysenteriae*, ceea ce demonstrează că aceste bacterii fac parte din aceeași specie biologică *(genospecie)*, deși ele sînt considerate de bacteriologi ca reprezentînd specii înrudite, dar distincte, punct de vedere care, dealtfel, rămîne justificat pentru numeroase considerente de ordin practic.

Unii autori propun ca unitate fundamentală de clasificare *clona*, care reprezintă populația bacteriană circumscrisă într-un spațiu determinat și compusă din celule derivate, toate, pe cale asexuată, prin diviziuni succesive, dintr-o unică celulă parentală. După Prévot (1961), specia constă din totalitatea clonelor identice.

Astfel definită, noțiunea de specie implică omogenitate fiziologică absolută sub raportul caracterelor principale (echipament enzimatic, metabolism, acțiune patogenă specifică și, dacă este cazul, toxigeneză), dar nu este incompatibilă cu o oarecare eterogenitate, în ceea ce privește modul de manifestare al acestor caractere (nivelul activității enzimatice, gradul de virulență, aspectul cantitativ al toxigenezei etc.). Pornind de la observația că transferul genetic realizat prin fenomene de sexualitate are la bacterii o incidență foarte scăzută, Lwoff consideră că pentru aceste microorganisme este mai adecvată utilizarea conceptului de *specie asexuată*. Specia bacteriană ar fi, în acest caz, definită ca o populație formată din unul sau mai multe biotipuri care se reproduc asexuat. Biotipul reprezintă forma în care microorganismele există în natură și este constituit dintr-un grup de indivizi care posedă, în esență, același patrimoniu ereditar și, în consecință, sînt cu necesitate asemănători prin marea majoritate a caracteristicilor.

După Sokal (1966), „o specie este orice organism pe care un taxonomist competent hotărăște să îl numească o specie" și aceasta deoarece „cuvîntul specie este foarte predispus la ambiguitate" (Sneath, 1966).

Cowan (1968, 1975) consideră specia bacteriană ca formată dintr-un grup de organisme definit mai mult sau mai puțin subiectiv, pe criterii alese de taxonomist pentru a evidenția cît mai bine posibil ceea ce îl avantajează și pentru a pune în practică concepția sa individuală despre ceea ce este specia.

Pentru Gordon (1978), specia bacteriană este alcătuită dintr-un grup de tulpini sau populații de tulpini, provenite din surse diferite, izolate recent sau menținute *in vitro* perioade diferite de timp, ca și variantele lor, care au

în comun un set sau un anumit patern de proprietăţi stabile, corelate, ce caracterizează grupul respectiv şi îl separă de alte grupuri de bacterii.

După concepţia lui Sonea şi Panisset (1976, 1981), o variantă modernă a pleomorfismului, toate bacteriile existente în natură ar forma o singură specie, deoarece beneficiind de un fel de „solidaritate genetică" ele pot schimba între ele gene, oricît de diferite ar fi. În felul acesta, genele care poartă informaţie utilă, chiar temporar favorabilă, ar putea fi diseminate şi multiplicate preferenţial în populaţiile bacteriene, indiferent de natura membrilor lor. Lumea bacteriilor ar reprezenta, deci, o entitate biologică globală, planetară, un adevărat superorganism, răspîndit pe întreaga suprafaţă a globului, formînd o clonă unică de tip superior, alcătuită din celule care posedă în comun acelaşi genom potenţial.

Stanier (1976) consideră specia bacteriană ca o entitate strict empirică şi o defineşte, operaţional, ca o grupare de tulpini (populaţii clonale) avînd un înalt grad de similaritate fenotipică globală şi care poate fi deosebită de alte grupări de acelaşi fel printr-un mare număr de caractere independente. Definiţia nu implică o identitate fenotipică perfectă, deoarece variaţia genetică lucrează permanent şi creează o anumită variaţie fenotipică în cadrul grupului. Dificultatea majoră rezidă în lipsa unui criteriu obiectiv cu privire la gradul de deosebiri fenotipice, care îngăduie sau justifică desfacerea unei grupări în două sau mai multe specii, sau, altfel spus, care este gradul de diversitate internă permis într-o grupare ce este considerată ca o specie unică.

Pentru a ocoli dificultăţile în definirea speciei la bacterii, Ravin (1963) introduce trei concepte noi, care consideră specia, de fiecare dată, dintr-un singur punct de vedere:

1. *Taxospecia* reprezintă un grup de tulpini care au în comun o mare proporţie de proprietăţi similare. Ea corespunde modalităţii şi sensului în care un taxonomist utilizează în mod obişnuit termenul de specie. Spre exemplu, cînd acordăm statutul de taxospecie *E. coli* sau *B. subtilis* ne referim la organisme care seamănă mai mult sau mai puţin între ele şi diferă de indivizii care aparţin altor taxospecii. Conceptul de taxospecie are avantajul că permite propunerea unei chei de identificare.

2. *Genospecia* corespunde unui grup de organisme ai căror membri pot schimba gene între ei. Ca urmare, reuneşte bacterii deosebite fenetic (de ex., *E. coli* şi *Shigella dysenteriae)*, dar înrudite genetic pentru că descind dintr-un strămoş comun. În felul acesta, cele mai multe *Enterobacteriaceae* formează o singură genospecie.

La grupurile de bacterii la care s-au descris mecanisme de transfer genetic, noţiunea de genospecie este mult mai apropiată de noţiunea tradiţională de gen decît de categoria taxonomică numită tradiţional *specie*. La bacteriile la care aceste mecanisme nu se cunosc, genospecia reprezintă un concept lipsit de valoare, deoarece poate fi modificat oricînd de date noi.

3. *Nomenspecia* corespunde unui grup de organisme care poartă o denumire binominală, indiferent dacă membrii grupului respectiv pot fi etichetaţi ca specii diferite, pe alte criterii (de ex., două nomenspecii diferite, *Xanthomonas hyacinthi* şi *X. campestris*, pot fi unite într-una singură, dacă considerăm că nu merită statut separat).

Conceptul de nomenspecie este util pentru că în practică microbiologii se interesează de nomenspecie ca unitatea de clasificare cea mai accesibilă.

Determinatoarele actuale sînt aproape totdeauna cataloage de nomenspecii, iar identificarea bacteriilor (diagnosticul) stabileşte, din punct de vedere practic, o asemănare între o anumită tulpină şi o serie de tulpini tip, actuale sau dispărute, dar prestabilite. Criteriul este esenţial practic, dar neştiinţific, datorită faptului că, în lipsa unor date privind numărul de caractere suficient pentru a defini taxospecia, au fost create în mod abuziv un număr mare de nomenspecii noi, chiar pentru un număr mic de caractere aberante.

Sistemul lui Ravin are avantaje, decurgînd din caracterul operaţional al noţiunilor respective, precum şi din faptul că „specia bacteriană" adevărată nu se poate găsi decît la punctul de convergenţă al acestor trei concepte parţiale.

Definirea conceptului de specie la bacterii este îngreuiată de o serie de dificultăţi obiective ca: a) dimensiunile mici ale obiectului de clasat şi numărul mic de caractere morfologice uşor de evidenţiat; b) necesitatea de a studia cele mai multe caractere (în special cele biochimice) pe o populaţie (clonă) şi nu pe un organism izolat şi c) rolul mutaţiilor şi mai ales al schimbului de material genetic, condiţionat de plasmide, care modifică genotipul bacterian cu viteză mult superioară celei observate la organismele evoluate. În ciuda încercărilor de a se ocoli dificultăţile menţionate, definirea noţiunii de specie bacteriană rămîne încă foarte anevoioasă, întrucît nici una dintre formulările existente pînă în prezent nu satisfac toate exigenţele de ordin teoretic. Aceasta explică, pe de o parte, caracterul convenţional şi subiectiv al sistemelor actuale de clasificare a bacteriilor, iar, pe de altă parte, faptul că mulţi microbiologi recurg, totuşi, la definiţii şi delimitări provizorii care, deşi deficitare sub raport teoretic, au cel puţin meritul de a fi utilizabile în practică, atunci cînd este necesară identificarea unei anumite tulpini bacteriene.

În mod ideal, specia ar trebui caracterizată prin descrierea cît mai completă a fenotipului sau, mai bine, a genotipului. Cum acest lucru nu este posibil, în lipsa unor caractere definitorii unificatoare, conceptul de specie rămîne arbitrar, iar caracterizarea speciei bacteriene se face recurgînd la o serie de caractere descriptive care formează un spectru de expresii fenotipice (proprietăţi anatomice, structurale, biochimice, fiziologice, ecologice etc.), ilustrînd un eşantion al potenţialului genetic al microorganismelor respective. Multe bacterii pot fi identificate mai degrabă punînd în evidenţă ceea ce fac, decît prin aspectul lor.

TIPURILE DE CLASIFICARE

După Hill (1972, 1976) există trei tipuri diferite de clasificare nenumerică: 1) *clasificarea fenetică*, care pune în evidenţă relaţiile actuale dintre microorganisme şi este apropiată ca obiectiv de taxonomia numerică; 2) *clasificarea patristică* (gr. patr=tată), care relevă relaţiile generice globale şi poate fi abordată cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară şi 3) *clasificarea cladistică* (gr. clados = ramură, vlăstar tînăr), care încearcă să scoată în evidenţă liniile de evoluţie ce au dat naştere organismelor şi proprietăţilor lor, în raport cu scara timpului.

Clasificarea patristică şi cea cladistică, utilizate în taxonomie de Silvestri şi Hill (1964), ca şi de Cain şi Harrison (1960), sînt două aspecte ale

clasificării filogenetice. Clasificarea patristică a luat o mare dezvoltare datorită tehnicilor de studiu ale genomului bacterian (mărimea genomului, compoziția în baze, tehnicile de hibridare moleculară etc). În schimb, în cazul bacteriilor, clasificările cladistice au puține șanse de utilizare recentă, deoarece lipsa unor fosile semnificative și absența unor criterii științifice necesare pentru a face deducții pun cladistica bacteriană în mod obligatoriu pe o bază incertă, deși metodele noi de biologie moleculară îndreptățesc unele speranțe. Spectrul larg de compoziție în baze al ADN sugerează că toate bacteriile, ca întreg, au o origine foarte veche; chiar dacă din aceste studii se vor obține unele informații cladistice generale, posibilitatea de a obține clasificări cladistice detaliate ale bacteriilor este încă foarte îndepărtată (Hill, 1976).

Experiența acumulată pînă în prezent demonstrează, fără echivoc, că idealul este reprezentat de o sistematică bazată pe înrudiri filogenetice, dar acest lucru este foarte greu — dacă nu chiar imposibil — în prezent în bacteriologie și nici nu se știe dacă ar fi utilă pentru identificarea bacteriilor. Aceasta explică faptul că sistematica bacteriană are un caracter predominant pragmatic, vizînd să furnizeze normele de identificare și grupare a organismelor similare, în primul rînd în acord cu exigențele practicii.

ABORDĂRI GENETICE ȘI MOLECULARE ÎN TAXONOMIE

Datele de genetică au jucat un rol minor pînă în prezent în sistematica bacteriană, deși pot oferi informații importante asupra organizării substratului eredității și modificărilor care stau la baza evoluției. Una dintre explicații decurge din faptul că însuși domeniul geneticii bacteriene este foarte recent, fiind abordat după anul 1943. Datele genetice pot servi nu numai scopului practic al identificării și clasificării, ci și pentru a reflecta relațiile filogenetice dintre diferitele organisme. Conceptele genetice și evoluționiste bazate pe ideea originii comune și a unei posterități potențial comune a organismelor din același grup taxonomic au fost introduse de „noua sistematică" (Huxley, 1940), dar au fost preluate tardiv și indirect de sistematica bacteriană (Roper, 1962).

Scepticismul unor specialiști privind semnificația datelor genetice pentru sistematică este legată, în primul rînd, de faptul că cercetările recente au infirmat concepția după care constituția genetică a unei specii bacteriene este aceeași de la o celulă la alta și constantă pentru perioade îndelungate de timp (Novick, 1980). Numeroase date experimentale demonstrează fără echivoc că o proporție semnificativă din caracterele genetice sînt cunoscute ca variabile (prezente la unele celule individuale sau tulpini și absente la altele), labile (putînd fi pierdute sau cîștigate frecvent) și „mobile" (transferabile între celulele individuale sau transpozabile de la un situs la altul într-o celulă pe același replicon (cromosom sau plasmidă) sau pe repliconi diferiți (cromosom ⇄ plasmidă)), deoarece aceste trăsături sînt asociate cu plasmidele și alte sisteme genetice atipice. De asemenea, s-a făcut obiecția că, datorită frecvenței mari a transferului interspecific de gene, la bacterii, amestecul genetic este extensiv și rapid, determinînd acumularea în aceeași celulă a

unor gene care au un istoric diferit. Celula bacteriană ar fi o himeră genetică totală și nu ar avea o genealogie unică, fapt care ar face greu de definit o filogenie bacteriană reală (Ambler și colab., 1977). În opoziție cu acest punct de vedere, Woese (1980) și Dickerson (1980) consideră că cel puțin unii constituenți celulari se pot comporta ca adevărate „cronometre moleculare" care pot măsura genealogia întregii bacterii. Astfel, studiile independente asupra cit. *c* și ARNr ilustrează, cu o bună aproximație, aceeași relație între fotobacteriile purpurii, fapt care pledează în sensul acestei afirmații.

BAZELE CHIMICE ALE FILOGENIEI MOLECULARE. MOLECULELE CA DOCUMENTE ALE ISTORIEI EVOLUTIVE

Zuckerkandl și Pauling (1965), pornind de la ideea că sistemele biologice păstrează în organizarea lor, sub forma unor molecule caracteristice, cea mai mare parte din propriul lor trecut, grupează aceste molecule în trei categorii, în funcție de gradul în care natura informației specifice prezentă într-un organism este reflectată în structura și funcția lor.

Moleculele semantoforetice (gr. semantikos + phoros = purtător de semne) sau semantidele, care poartă informația genetică sau rezultatul transcrierii sau traducerii acesteia. Pot fi de gradul I (genele), de gradul II (ARNm) sau de gradul III (proteinele).

Moleculele episemantice sînt sintetizate sub controlul semantidelor terțiare — enzimele — în absența unei matrițe („template"). Deși nu exprimă extensiv informația prezentă în semantide, ele sînt produsul acesteia.

Moleculele asemantice nu sînt produse de organism și deci nu exprimă nici direct, nici indirect, vreo informație conținută în organism (exceptînd cazul în care prezența lor în organism este condiționată de un mecanism specific de absorbție).

După Pauling, cu ajutorul moleculelor semantoforetice se poate construi filogenia moleculară cea mai rațională, universală și informațională, deoarece ele păstrează o mai mare cantitate de date din istoria organismului respectiv decît oricare alt nivel unic de integrare biologică. Fox (1981) și Balch (1982), reluînd concepția lui Zuckerkandl și Pauling, consideră că analiza comparativă a moleculelor semantoforetice (ADN, ARN, proteine) a căror secvență primară poartă informația genomului sau este dedusă din aceasta reprezintă o măsură neutră și cantitativă a relațiilor cu semnificație filogenetică directă. Moleculele de ADN, ARN și proteine se pot comporta ca adevărate „cronometre moleculare" (în sens statistic, nu metronomic), capabile să măsoare nu numai relațiile evolutive, ci și distanțele evolutive (timpul relativ al divergenței), permițînd deducerea caracteristicilor unui ancestor comun (Fitch și Margoliash, 1967; Woese, 1982). Faptul că secvențele genetice corelate cu o funcție dată au o semnificație atît de mare în stabilirea unor înrudiri are o importanță deosebită deoarece la nivel fenotipic, dimensiunile mici și morfologia simplă a bacteriilor nu au permis determinarea relațiilor naturale și stabilirea unor criterii adecvate pentru o clasificare filogenetică.

Balch (1982) propune denumirea de *molecule sintactice* (derivată de la cuvîntul sintaxă) pentru produșii funcției semantidelor, care definesc cele mai multe proprietăți fenotipice ale celulelor, ca, de exemplu, căile metabo-

lice specifice, compoziția chimică a peretelui celular sau a unor molecule, cum sînt coenzimele. Deși ele sînt utile în definirea unor grupări de microorganisme în schemele taxonomice, spre deosebire de semantide, reprezintă numai o măsură indirectă a relațiilor. Gradul actual de apreciere a diversității procariotelor este realizat pe criterii bazate pe moleculele sintactice (Gibbons și Murray, 1978).

Pornind de la ideea că macromoleculele informaționale (semantidele) sînt efectiv înregistrări ale istoriei organismului respectiv, Wilson, Carlson și White (1977) au recomandat „citirea" și analiza lor comparativă pentru a revela relațiile genealogice.

Tehnicile de biologie moleculară au făcut posibilă compararea directă sau indirectă a informației inclusă în ADN, utilizînd procedee diferite ca, de exemplu: 1) compoziția în baze (% G + C); 2) determinarea secvenței bazelor în molecula de ADN; 3) hibridarea ADN—ADN sau ADN—ARN; 4) capacitatea de a transfera gene și de recombinare genetică etc.

COMPOZIȚIA ÎN BAZE A ADN *)

Determinarea compoziției în baze a ADN, considerată ca o sursă importantă de date specifice, se efectuează cu teste indirecte ca: temperatura de topire („melting point"), respectiv de denaturare a ADN de la structura dublu catenară la structura monocatenară prin ruperea legăturilor de hidrogen intercatenare, după tehnica lui Marmur și Doty (1962), sau tehnica densității de plutire („buoyant density") a lui Schildkrant (1962). Tehnicile nu determină compoziția în baze, ci parametrii de la care poate fi estimată.

Analiza ADN prin metode fizicochimice a arătat că pentru fiecare organism, compoziția în baze este constantă și caracteristică, variind în natură între 25 și 75 %. Determinarea ei la plante și animale, la care este foarte asemănătoare și cu limite foarte apropiate (~ 35—40 % G + C), este lipsită de importanță taxonomică. Compoziția G + C este mult mai importantă la bacterii, la care variațiile se înscriu în limite largi, fiind cuprinse între 30 și 70 % (Marmur, 1963). S-a demonstrat că fiecare specie bacteriană cunoscută are un conținut G + C caracteristic și că la organismele cunoscute ca fiind foarte înrudite pe alte criterii, compoziția în baze a ADN este similară sau identică. De Ley (1968) consideră că bacteriile care diferă cu 20 % G + C nu au practic nici o porțiune mai lungă din secvența nucleotidică în comun, iar Johnson (1973), pe baza unor studii ample, precizează că dacă două tulpini bacteriene, altfel relativ similare, diferă prin 2—3 moli % G + C pot fi considerate ca specii diferite.

Trebuie menționat că asemănarea compoziției în baze nu semnifică în mod obligatoriu omologia ADN, deoarece cele două organisme pot diferi prin secvența bazelor în molecula de ADN (spre ex., genomul tuturor vertebratelor, inclusiv cel uman, conține aproximativ 44 % G + C, ca și acela al unor microorganisme, dar, deși compoziția în baze este foarte asemănătoare, secvențele bazelor sînt extrem de deosebite). Ca regulă generală, de asemenea, o divergență substanțială între două organisme sub raportul compoziției lor în baze reflectă un mare număr de diferențe individuale între secvențele specifice de baze ale moleculelor respective ale ADN și exclude posibilitatea

*) Aspectele generale legate de problemele de genetică vor fi prezentate în volumul III.

unor legături evolutive între ele (Adelberg, 1974). Tehnica este utilizată pentru caracterizarea şi aranjarea sistematică a unei specii noi, necunoscute, dar este puţin importantă ca instrument de identificare rapidă.

HIBRIDAREA ADN

Omologia ADN poate fi cuantificată prin gradul de formare a unor molecule hibride, pornind de la două catene de ADN cu provenienţe diferite. ADN monocatenar provenit de la organisme înrudite formează molecule dublu catenare hibride în zonele în care secvenţele de baze sînt foarte asemănătoare printr-un proces de „renaturare" („annealing"). Reasocierea depinde de gradul de complementaritate dintre secvenţele de baze şi, ca urmare, poate fi utilizată pentru a măsura gradul de asemănare dintre ADN cu origini diferite. Experienţele de hibridare se fac uzual cu ADN monocatenar marcat radioactiv provenit de la un organism şi ADN m.c. normal (nemarcat) de la altul.

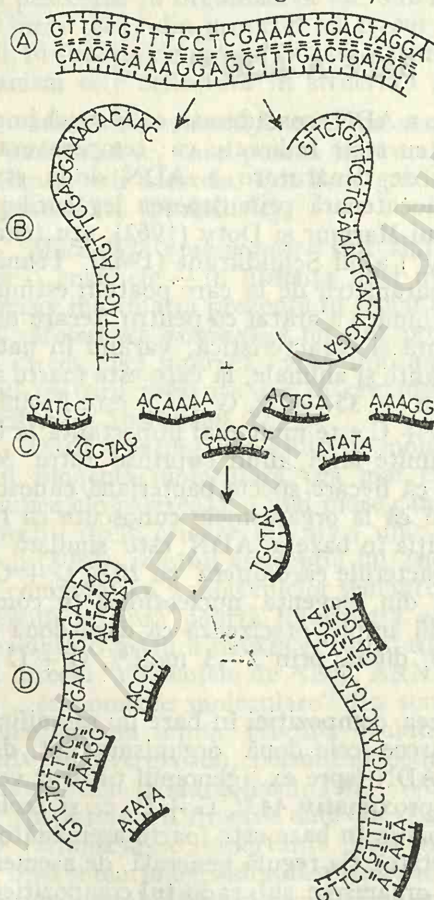


Fig. 220. — Reprezentarea schematică a unei reacţii de hibridare ADN—ADN pentru compararea secvenţelor nucleotidice ale ADN provenit de la două specii bacteriene. ADN provenit de la una din specii (A) este denaturat prin încălzire sau tratare cu alcali (B) pentru a separa cele două catene. Se adaugă mici fragmente monocatenare marcate radioactiv provenite din denaturarea ADN al celei de-a doua specii (C). Amestecul este încălzit şi lăsat să se răcească lent. În cursul procesului de renaturare („annealing"), unele fragmente de ADN marcat formează regiuni hibride dublu catenare, ce devin rezistente la DN-ază (D), spre deosebire de regiunile monocatenare, care, fiind sensibile, vor fi degradate.

Figura 220 prezintă schematic o experienţă tipică de hibridare ADN—ADN cu scopul comparării secvenţei de baze nucleotidice ale ADN provenit de la două tulpini ale unor specii bacteriene înrudite. ADN d.c. (A) provenit de

la specia SA este denaturat prin încălzire sau tratament cu alcali pentru a obține două catene separate, care sînt menținute în condiții ce împiedică reasocierea („renaturarea") lor. B) Se adaugă mici segmente de ADN m.c., provenite de la specia SB, care sînt marcate radioactiv datorită cultivării într-un mediu cu ^{15}N. C) Amestecul este răcit lent pentru a permite renaturarea în cursul căreia segmentele oligonucleotidice omologe, provenite de la specia SB, se vor lega de regiunile complementare ale ADN provenit de la specia SA, formînd regiuni dublu catenare hibride, rezistente la digestia cu endonuclează (D). Dacă cele două probe de ADN ar fi integral omologe, toate segmentele de ADN m.c. marcat radioactiv s-ar lega prin hibridare, formînd molecule de ADN d.c. rezistente la endonuclează. Dacă este complet neomolog va fi degradat ca și fragmentele de ADN m.c. de enzimele respective.

Experiențele de hibridare se pot face utilizînd pentru una din tulpini ARNm în loc de ADN, deoarece secvența de baze a ARNm este complementară uneia dintre catenele ADN și identică cu cealaltă. În acest caz se obțin molecule hibride ADN—ARN în loc de ADN—ADN. Studiile privind hibrizii ADN—ARN sînt efectuate pe un număr limitat de bacterii și par potrivite în special pentru investigarea relațiilor taxonomice deasupra nivelului de specie.

Pentru a fi utilizate în taxonomie, datele rezultate din hibridarea ADN trebuie exprimate cantitativ, în raport cu ADN provenit de la o tulpină de referință. Tabelul nr. 41 prezintă rezultatele hibridării între ADN de *E. coli* (tulpină de referință) marcat cu ^{14}C și ADN de la alte bacterii. S-a apreciat arbitrar gradul de legare omologă *(E. coli—E. coli)* cu 100%. Legarea cu alte categorii de ADN a fost exprimată în raport cu aceasta. Tehnica hibridării ADN este foarte importantă pentru a explora „în mare" omologia genetică

Tabelul nr. 41

Omologia ADN provenit de la diferite bacterii (după Carty, 1963; Martin, 1967; Brenner, 1973)

Sursa de ADN marcat	% relativ de legare (înrudire) față de *E. coli*	Sursa de ADN marcat	% relativ de legare (înrudire) față de *N. meningitidis*
Escherichia coli	100	*Neisseria meningitidis*	100
Shigella dysenteriae	89	*Neisseria gonorrhoeae*	80
Salmonella typhimurium	71	*Neisseria perflava*	55
Enterobacter aerogenes	51	*Neisseria subflava*	48
Serratia marcescens	20	*Neisseria catarrhalis*	15
Proteus vulgaris	14	*Neisseria caviae*	10
Pseudomonas aeruginosa	1	*Neisseria herellea*	5
Bacillus subtilis	1	*Escherichia coli*	3
Brucella neotamae	0	*Rinichi de maimuță*	0,1

a multor grupuri de bacterii. Ea este utilă doar pentru organisme strîns înrudite, aparținînd aceluiași gen sau, preferabil, aceleiași specii. În general, bacteriile din aceeași specie au o omologie de peste 70%, în condiții stricte de reasociere. Această tehnică nu dă informații detaliate asupra relațiilor specifice, ci numai o apreciere în mare asupra similarității globale a secvenței ADN.

SEMNIFICAŢIA TAXONOMICĂ A TRANSFERULUI DE MATERIAL GENETIC ŞI A RECOMBINĂRII GENETICE

Gradul de omologie genetică dintre diverse tulpini bacteriene poate fi apreciat la nivel de genom prin posibilitatea realizării proceselor de transfer de material genetic (transformare, conjugare, transducţie etc.) şi, mai ales, prin frecvenţa cu care materialul genetic transferat de la celula donatoare este integrat, prin recombinare, în genomul celulei receptoare. În general, frecvenţa de recombinare reprezintă un indicator fin al omologiei dintre donator şi receptor, deoarece cu cît înrudirea genetică a acestor parteneri celulari este mai strînsă cu atît frecvenţa de integrare a fragmentului de genom este mai mare. Spre exemplu, în urma procesului de conjugare s-au obţinut hibrizi (recombinanţi genetici) între *E. coli*, *Shigella* şi *Salmonella*, care au un grad mare de omologie şi apar strîns înrudite prin testele de hibridare moleculară a ADN. În schimb, nu s-au obţinut recombinanţi între *E. coli* şi *Serratia* sau *Proteus*, deşi hibridarea ADN *in vitro* detectează, şi în aceste cazuri, un anumit grad de înrudire.

În funcţie de importanţa lor taxonomică pot fi recunoscute 3 clase de fenomene (în ordinea descendentă a semnificaţiei): 1) integrarea genelor; 2) transmiterea şi exprimarea genelor; 3) fenomene genetice asociate. Diferitele fenomene din cele trei clase sînt: 1) *integrarea genelor:* recombinare genetică după transformare, transducţie completă, conjugare, lizogenizare tip fagul λ; 2) *transmiterea şi exprimarea genelor:* infecţia şi liza fagică, transfecţia, infecţia cu plasmide (FR, Col.) şi 3) *fenomene genetice asociate:* adsorbţia fagului, sensibilitatea la bacteriocine etc. Relaţia dintre ele poate fi ilustrată luînd ca exemplu ecosistemul fag — bacterie, după schema: lizogenizarea receptorului indică o înrudire taxonomică mai strînsă decît liza fagică, şi aceasta, la rîndul său, indică o relaţie mai strînsă decît adsorbţia fagului. Deşi nu oferă în măsură suficientă elementele de bază ale unei clasificări naturale, datele de genetică bacteriană contribuie, totuşi, în mod eficient, la elaborarea unui sistem de clasificare, capabil să reflecte, cît mai mult posibil, relaţiile filogenetice ale diferitelor grupe de bacterii, prin gradul lor de înrudire ereditară şi potenţialul lor de a avea descendenţi cu caractere comune.

STABILIREA RELAŢIILOR DE ÎNRUDIRE DINTRE SPECII ŞI A FILIAŢIEI LOR EVOLUTIVE CU AJUTORUL ARNr

În ultimii ani s-au făcut eforturi pentru cunoaşterea relaţiilor filogenetice dintre bacterii şi pentru măsurarea lor. Sogin (1972), Fox şi Woese (1980) au propus moleculele de ARN ca semantidele cele mai adecvate pentru studiile de acest gen, bazîndu-se pe următoarele argumente: 1) ARNr, ca şi ribosomii, are o origine foarte veche, este universal răspîndit şi uşor de izolat; 2) el a rămas constant ca funcţie de-a lungul unor mari distanţe evolutive şi 3) structura primară a ARNr variază puţin de la o specie la alta şi conţine secvenţe foarte conservatoare, care se modifică foarte lent în timp, în aşa fel încît secvenţele ancestrale pot fi încă detectate, favorizînd stabilirea distanţelor evolutive dintre specii foarte îndepărtate. Cel mai potrivit dintre

tipurile de ARNr cunoscute este ARNr 16 (18)S (fig. 221), care este suficient de mare (1 540 de nucleotide) pentru a forma un ansamblu statistic suficient de sigur pentru studiul relaţiilor filogenetice. ARNr 5 S, deşi mai mic şi mai uşor de caracterizat, s-a dovedit mai puţin potrivit (Hori şi Osawa, 1979).

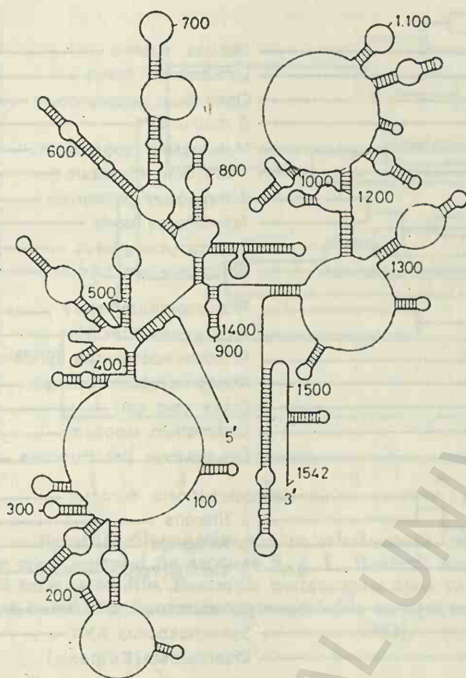


Fig. 221. — Structura schematică a ARN ribosomal 16 S izolat de la *E. coli* (după Woese, 1981).

Woese (1975) a studiat ARNr 16 S provenit de la 40 de specii de bacterii, aparţinînd la 18 genuri din taxonomia tradiţională. Întrucît în perioada respectivă nu exista posibilitatea determinării secvenţei bazelor în molecula intactă — ca în prezent —, moleculele de ARNr au fost secţionate cu ajutorul ribonucleazei T1 în fragmente („cuvinte") cu lungimi variabile, de la un nucleotid (o „literă" de cod) pînă la 20 de nucleotide, după care a determinat secvenţa bazelor în fiecare „cuvînt". Utilizînd secvenţa bazelor în cuvintele de 6 sau mai multe litere, a elaborat un „dicţionar" sau „catalog", caracteristic pentru fiecare bacterie studiată care poate fi comparat, pe rînd, cu alte „dicţionare" similare pentru a determina reacţiile genealogice. Pentru analiza rezultatelor a folosit un coeficient de asociere binară S_{AB}, definit ca 2 × suma bazelor din oligonucleotide cu lungimea egală sau mai mare de 6 baze ($\geqq 6$) comune celor două „dicţionare" A şi B, împărţit la suma bazelor prezente în toate oligonucleotidele din A + B:

$$S_{AB} = \frac{2 \times \text{suma nucleotidelor comune din } A + B}{\text{suma nucleotidelor tuturor oligonucleotidelor din } A + B}$$

Studiul comparativ al secvenţei ARNr 16 S (18 S) a demonstrat, prin analiza coeficientului de asociere S_{AB}, că bacteriile „adevărate" *(Eubac-*

teria ~200 de specii studiate), formează un grup foarte mare de organisme deosebite de eucariote (fig. 222). Arhebacteriile, deşi sînt procariote şi bacterii prin toate caracteristicile lor superficiale, sînt, la rîndul lor, deosebite

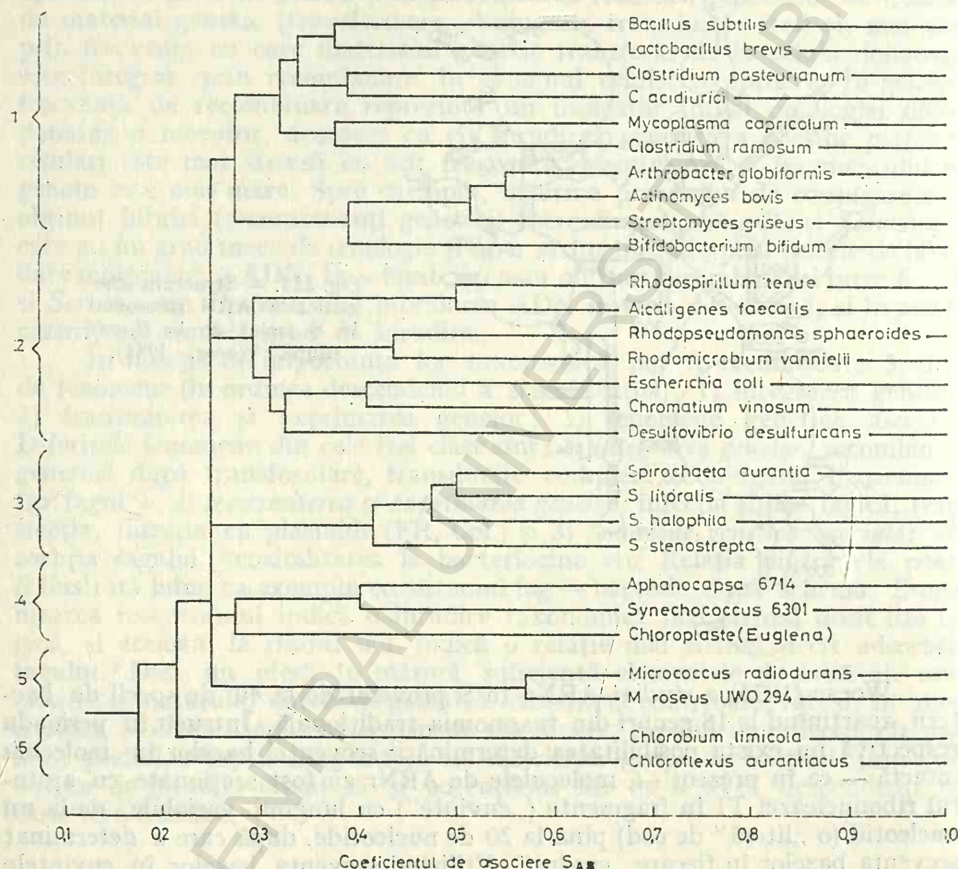


Fig. 222. — Dendrograma eubacteriilor prezentînd şase grupuri majore. **1.** Bacterii Gram-pozitive. **2.** Bacterii fotosintetizante purpurii şi unele bacterii înrudite, nefototrofe, care au pierdut probabil această proprietate ancestrală. **3.** Spirochete. **4.** Cianobacterii. **5.** Bacterii sferice cu perete celular atipic şi cu rezistenţă mare faţă de radiaţii. **6.** Bacterii fotosintetizante verzi (după Woese, 1982).

de bacterii (ca şi de eucariote) sub raportul unor proprietăţi mai subtile şi mai vechi, respectiv prin secvenţa moleculară a bazelor în ARNr şi, aşa cum s-a demonstrat, printr-o serie de detalii de funcţionare la nivel molecular. Concluzia este că, arhebacteriile reprezintă o grupare separată distinctă de bacterii (ca şi de eucariote) la cel mai înalt nivel de clasificare (Woese şi colab., 1975, 1982) şi par o ramură evolutivă care antedatează cu mult apariţia primei bacterii adevărate, strămoşul bacteriilor actuale (fig. 223). Coeficientul S_{AB} variază între 1,0 cînd „dicţionarele" A şi B sînt identice şi mai puţin

de 0,1 cînd sînt deosebite. De regulă însă, coeficientul este mai mare decît zero (0,02 = distribuţie aleatorie), chiar în cazul bacteriilor neînrudite, datorită corespondenţelor întîmplătoare dintre secvenţele nucleotidelor.

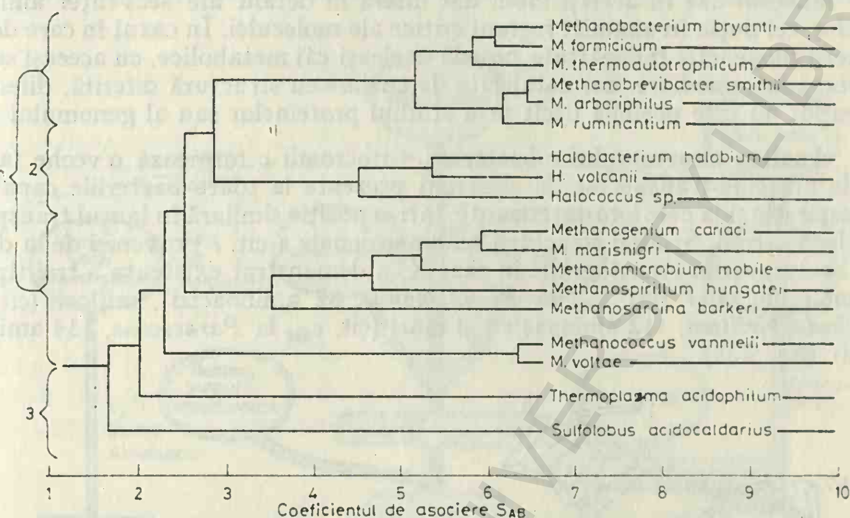


Fig. 223. — Relaţiile filogenetice dintre arhebacterii, reprezentate într-o dendrogramă bazată pe valorile coeficientului de asociere S_{AB}. 1. Bacterii metanogene. 2. Bacterii halofile extreme. 3. Bacterii termoacidofile. Bacteriile metanogene apar ca un grup foarte vechi, în cadrul căruia s-au format halofilele. Bacteriile termoacidofile au apărut, probabil, independent (după Woese, 1982).

Înregistrînd valorile S_{AB} pentru un număr de organisme într-o matrice, se poate stabili gradul de înrudire, respectiv de deosebire dintre ele. De asemenea, este posibil să se construiască dendrograme, care exprimă relaţiile dintre membrii grupului. Metoda a permis, de asemenea, o clasificare a bacteriilor metanogene (fig. 223) la care spectrul de proprietăţi sintactice neobişnuite (de morfologie, structura şi compoziţia peretelui celular, compoziţia în baze a ADN, metabolismul intermediar, biochimia metanogenezei, detaliile „maşinăriei" de transcriere şi traducere a informaţiei genetice etc.) s-au dovedit într-o remarcabilă corelaţie cu structura filogenetică derivată de la semantide (Balch, 1982).

SEMNIFICAŢIA TAXONOMICĂ A DATELOR EPIGENETICE

Stanier (1971) a propus utilizarea în taxonomie a datelor epigenetice furnizate de studiul produsului stabil al genelor şi corelate deci cu procesele de exprimare a genelor (transcriere—traducere etc. şi cu interacţiunile materialului genetic.

Structura primară a proteinelor enzimatice. Studiul structurii primare a proteinelor (secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic) este important pentru că există proteine enzimatice izofuncţionale, care pot avea structuri

diferite, deoarece conţin o informaţie genetică diferită în molecula de ADN. Datorită acestui fapt pot exista două bacterii, cu manifestări metabolice funcţionale identice, asigurate de enzime cu structuri tridimensionale similare, care funcţionează în acelaşi mod, dar diferă în detalii ale secvenţei aminoacizilor, cel puţin în anumite regiuni critice ale moleculei. În cazul în care două bacterii filogenetic îndepărtate posedă aceleaşi căi metabolice, cu aceeaşi suită de etape intermediare, dar catalizate de enzime cu structură diferită, diferenţierea lor nu este posibilă decît prin studiul proteinelor sau al genomului lor.

Analiza citocromului *c* bacterian. Citocromii *c* formează o veche familie de proteine-transportor de electroni prezente la toate bacteriile capabile de respiraţie şi la cele fotosintetizante, într-o poziţie similară în lanţul transportor de electroni. Studiul structurii tridimensionale a cit. *c* proveniţi de la diferite bacterii, prin cristalografie în raze X, a demonstrat existenţa a trei tipuri de molecule mici (cit. c_{551} la *Pseudomonas*, 82 aminoacizi), mijlocii (cit. c_2 la *Rhodospirillum*, 112 aminoacizi) şi mari (cit. c_{550} la *Paracoccus*, 134 aminoacizi) (fig. 224).

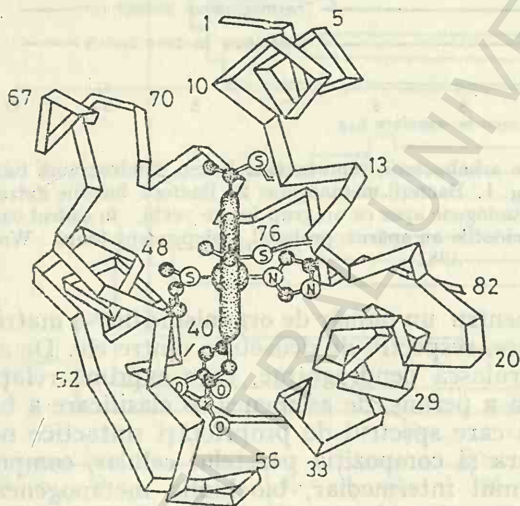


Fig. 224. — Structura spaţială a citocromului C_{551} la *Pseudomonas* avînd 82 de aminoacizi (după Dickerson, 1979).

Studiul secvenţei aminoacizilor în cit. *c* proveniţi de la 40 de specii bacteriene diferite a demonstrat posibilitatea elaborării unor diagrame de genealogie moleculară, pornind de la premisa că cu cît separarea strămoşilor organismelor actuale a fost mai îndepărtată în trecut cu atît sînt mai mari diferenţele actuale, acumulate în succesiunea aminoacizilor din structura lor (Dickerson, 1980) (fig. 225). Fitch şi Margoliash (1977) apreciază pe baza studiului cit. *c*, că substituirea aminoacizilor în cursul evoluţiei se face cu ritmul de un aminoacid la fiecare 23 de milioane de ani. Studiul cit. *c* sugerează că strămoşii metabolici ai organismelor actuale au fost bacteriile fotosintetice, de la care a derivat metabolismul energetic respirator.

Studiul imunologic al proteinelor bacteriene. Cercetările de imunologie comparată a proteinelor pure cu o structură primară cunoscută au arătat existenţa unei corelaţii strînse între secvenţa aminoacizilor şi gradul de simila-

ritate imunologică, apreciat, spre exemplu, prin reacţiile de fixare a complementului, foarte sensibile la diferenţe mici în secvenţa aminoacizilor. Tehnicile imunologice măsoară numai similaritatea de suprafaţă a proteinelor, care, dealtfel, prezintă şi cel mai mare grad de variabilitate. Pe baza acestei con-

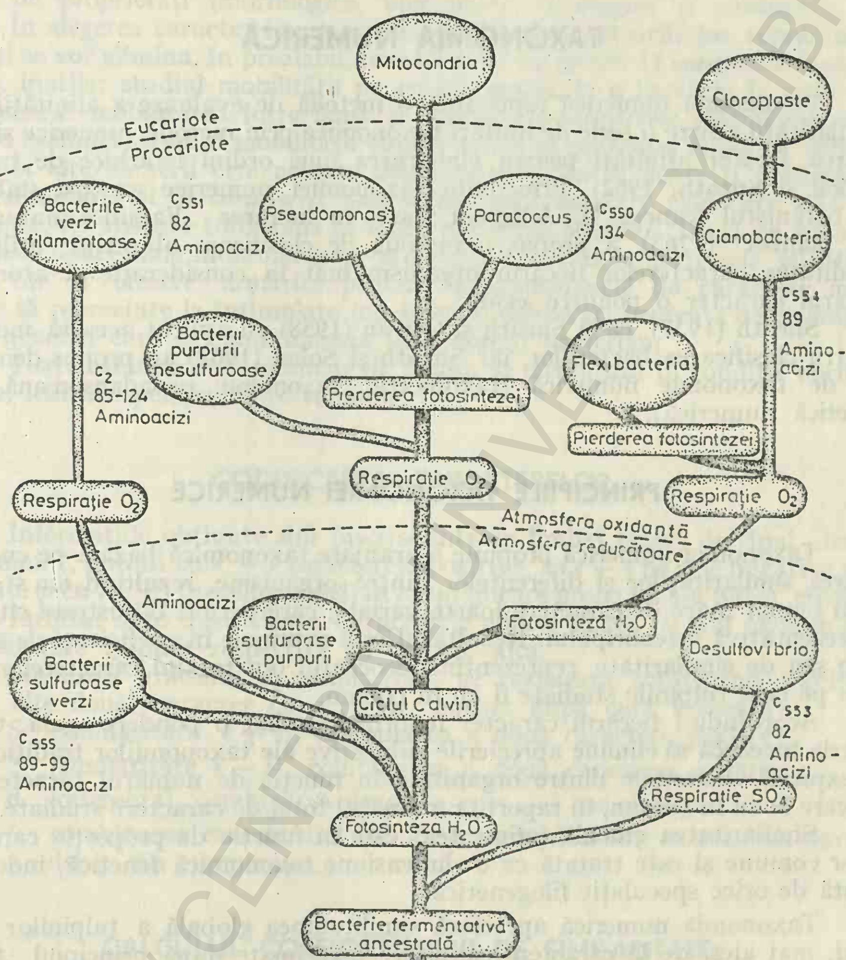


Fig. 225. — Schema evoluţiei principalelor categorii de microorganisme, bazată pe studiul structurii citocromilor de tip *c* (după Dickerson, 1980).

statări, studiul imunologic al unor proteine bacteriene (fosfataze alcaline, ADN-polimeraze, catalaze, aldolaze, lactic dehidrogenaze etc.), cu grad înalt de omologie poate furniza informaţii importante privind înrudirile filogenetice. Valabilitatea acestor studii este demonstrată de Wilson şi colab. (1977) care au arătat că la organismele eucariote arborii filogenetici construiţi pe baza datelor imunologice referitoare la proteinele omologe sînt în acord cu cei derivaţi din datele morfologice şi paleontologice.

Un rol important au diferitele tehnici serologice care au permis, spre exemplu, diferențierea antigenelor O, H și K la *Enterobacteriaceae* și gruparea bacteriilor din genul *Salmonella* în peste 1 000 de taxoni infraspecifici de tip serovar.

TAXONOMIA NUMERICĂ

Taxonomia numerică reprezintă o metodă de evaluare a afinității sau similarității dintre o serie de unități taxonomice prin metode numerice și utilizarea acestor afinități pentru elaborarea unei ordini ierarhice de taxoni (Sokal și Sneath, 1962). Principiile taxonomiei numerice au fost stabilite de botanistul francez M. Adanson, care, în lucrarea „Familles naturelles des plantes" (1763), a propus o metodă de clasificare obiectivă, utilizînd totalitatea caracterelor fiecărui organism luat în considerație și acordînd fiecărui caracter o pondere egală.

Sneath (1957), ca și Sneath și Cowan (1958) au aplicat această metodă pentru clasificarea bacteriilor, iar Sneath și Sokal (1962) au propus denumirea de taxonomie numerică (taxometrie, taxonomie neoadansoniană sau fenetică numerică).

PRINCIPIILE TAXONOMIEI NUMERICE

Taxonomia numerică propune o aranjare taxonomică bazată pe cuantificarea similarităților și diferențelor dintre organisme, rezultînd din studiul unui număr mare de caractere foarte variate, care permit o ilustrare cît mai reprezentativă a fenotipului. Rezultatul este exprimat în coeficienți de afinitate sau de similaritate, reprezentînd procentul din totalul caracterelor testate pe care tulpinile studiate îl au în comun.

Acordîndu-i fiecărui caracter fenotipic studiat o pondere egală, taxometria încearcă să elimine aprecierile subiective ale taxonomiilor tradiționale și exprimă distanțele dintre organisme în funcție de numărul caracterelor pe care le au în comun, în raport cu numărul total de caractere studiate.

Similaritatea globală (afinitatea) este în funcție de proporția caracterelor comune și este tratată ca o dimensiune taxonomică fenetică, independentă de orice speculație filogenetică.

Taxonomia numerică apreciază similitudinea globală a tulpinilor plecînd, mai ales, de la caractere calitative (exprimate după principiul „totul sau nimic"). Ea consideră că taxonomia ideală, „naturală", este aceea în care taxonii au un cît mai mare conținut de informație, respectiv sînt bazați pe cît mai multe caractere posibil.

ALEGEREA CARACTERELOR

Se recomandă ca numărul minim de tulpini studiate să fie de 20. Pentru tulpinile individuale se folosește termenul de „unitate taxonomică operațională" sau prescurtat în nomenclatura internațională OTU („operational taxonomic unit"). Numărul de caractere studiate trebuie să fie mare, deoa-

rece cu cît fenotipul este mai precis cunoscut cu atît el oferă o imagine mai fidelă a genotipului. Pentru rațiuni de ordin statistic, acest număr trebuie să depășească 60 și să atingă, de preferință, numărul de 100. Peste acest număr, cîștigul de informație este din ce în ce mai mic. Caracterele trebuie să fie independente și să se refere — pe cît posibil — în mod egal la diferite categorii de proprietăți (morfologice, biochimice, fiziologice și serologice).

În alegerea caracterelor se va ține seama de trăsăturile lor reprezentative și se vor elimina, în prealabil, următoarele categorii: 1) *caracterele redundante*, inutile: studiul mobilității pe geloză moale, la o bacterie la care s-a demonstrat mobilitatea între lamă și lamelă; 2) *caracterele interdependente*, ca, de exemplu, studiul mobilității cuplat cu cel al prezenței cililor la eubacterii (la alte bacterii este necesar deoarece mobilitatea poate fi produsă și prin alunecare) și 3) *caracterele nesemnificative*, respectiv cele care sînt fie prezente, fie absente totdeauna la toate bacteriile studiate. După ce s-a stabilit lista unui număr mult mai mare de caractere, se trag la sorți cele 60—100, care vor fi efectiv urmărite pentru ca eșantioanele de caractere analizate să reprezinte la întîmplare (nu în mod deliberat) prezența determinanților genetici care le condiționează în genomul bacterian.

Toate examenele și tehnicile de studiu se efectuează în condiții normalizate, identice pentru toate tulpinile.

CODIFICAREA CARACTERELOR

Informațiile obținute sînt înscrise într-un limbaj binar, de tipul „totul sau nimic", notînd cu « + » caracterele pozitive, cu « — » pe cele negative sau absente și cu NC (/) (necomparabil) în cazul în care proba nu s-a putut efectua sau a furnizat date insuficiente. Caracterele notate cu NC (/) sînt excluse din comparațiile tulpinii respective cu oricare alta.

Stabilirea gradului de similaritate se realizează comparînd tulpinile două cîte două, caracter cu caracter, notînd după cum urmează:

S^+ (similaritate « + »), combinarea a două caractere pozitive,

S^- (similaritate « — »), combinarea a două caractere negative,

d (diferența), combinarea de « + » cu « — » sau invers,

/ combinarea caracterului NC cu oricare altul are ca rezultat excluderea din comparație.

CALCULUL COEFICIENTULUI DE SIMILARITATE

Compararea tulpinilor microbiene, două cîte două, caracter după caracter, are drept rezultat stabilirea unui număr de similitudini pozitive, negative și de diferențe pentru fiecare pereche de tulpini.

Coeficientul de similaritate (S), care unește cele două tulpini, este dat de raportul dintre numărul de similitudini și numărul total de caractere comparate pentru cele două tulpini. Calculul poate fi făcut după două metode generale, care diferă sub raportul luării în considerație a similitudinii negative.

Metoda Sneath, cea mai simplă, stabilește gradul de similaritate în funcție de numărul similitudinilor pozitive și de numărul diferențelor, utili-

zînd coeficientul lui Jaccard, după care:

$$S_j = \frac{NS^+}{NS^+ + Nd}$$

în care: NS^+ = numărul de caractere similare,
Nd = numărul diferențelor sau al caracterelor care nu sînt comune «+» la o tulpină, «—» la alta).

Metoda este criticabilă, deoarece neagă orice semnificație caracterelor negative, admițînd apriori că un caracter negativ corespunde absenței sau alterării genei corespunzătoare. Întrucît, însă, este demonstrat că un caracter poate fi numai aparent negativ, datorită fie unor mecanisme de reglare, fie unor tehnici inaccesibile, se poate admite că, în principiu, un caracter negativ poate avea o valoare egală cu aceea a unui caracter pozitiv.

A doua metodă de calcul, care ține seama și de caracterele S^-, utilizează drept coeficient de similaritate *coeficientul de grupare simplă în perechi* („simple matching coefficient"),numit de autorii francezi „coeficient de împerechere de gradul întîi („Coefficient d'appariement au premier degré") (Sokal și Sneath, 1963). Se calculează după formula:

$$S_{SM} = \frac{NS^+ + NS^-}{NS^+ + NS^- + Nd}$$

Această metodă este mai laborioasă, deoarece numărul coeficienților (N) care trebuie calculați, corespunzînd numărului de perechi de tulpini de comparat, este foarte mare:

$$N = \frac{n(n-1)}{2}$$

în care: n = numărul tulpinilor studiate.
Cînd n = 50, N = 1 225 coeficienți de calculat;
cînd n = 100, N = 4 950.

ASAMBLAREA TULPINILOR ÎN GRUPURI TAXONOMICE NATURALE

Coeficienții de similaritate traduc similaritatea globală a fiecărei tulpini, în raport cu alta. Dacă se reunesc într-un singur grup *(cluster)* tulpinile care au cea mai mare asemănare între ele (cel mai mare coeficient S), se construiesc grupuri naturale de asemănare fenetică, numite de Sokal și Sneath cu denumirea generică de *fenoni*. Fig. 226 a se referă la un exemplu de studiu a 10 tulpini, numerotate arbitrar A — J, la care s-au calculat și clasat, în ordinea valorii lor descrescînde, coeficienții de similaritate ai tuturor combinațiilor posibile. Ulterior, coeficienții de similaritate pentru fiecare tulpină (OTU) în parte, pe rînd cu toate celelalte studiate, sînt înregistrați pe o matrice de similaritate triunghiulară, cu dublă intrare, după ordinea arbitrară a tulpinilor (fig. 226 b).

Matricea de similaritate (diagrama lui Sneath) are aspectul unei table de șah sau grile de cuvinte încrucișate, în care sînt figurate valorile coeficienților S, pentru fiecare pereche de tulpini, pe un pătrat cu atît mai umbrit

cu cît S este mai mare. Cu cît coeficientul de similaritate este mai scăzut, cu atît valoarea sa taxonomică este mai mică, deoarece nu conține decît tulpini reunite printr-un coeficient puțin important. În faza următoare, matricea

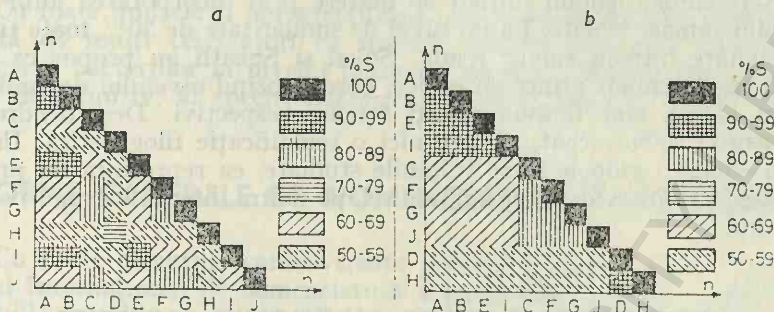


Fig. 226. — a) Diagrama unei matrice a coeficienților de similaritate între tulpinile A, B, C... J, luate două cîte două. b) Aranjînd aceleași date în ordinea valorii coeficienților de similaritate se formează grupuri caracteristice de tulpini (fenoni) reprezentate prin triunghiuri (după Sneath și Sokal, 1962).

de similaritate este rearanjată — pe bază de observație — în așa fel încît coeficienții de asemănare să fie așezați în ordinea valorii lor. În acest caz, tulpinile cele mai asemănătoare între ele sînt juxtapuse, formînd grupuri de taxoni naturali numite fenoni. Ca urmare, pe matricea definitivă (fig. 226 b), fenonii apar ca zone triunghiulare puternic umbrite, formate de tulpinile care au cei mai mari coeficienți de similaritate.

Ordinea descrescîndă a coeficienților S poate fi reprezentată și sub forma unei dendrograme, care permite determinarea aranjării taxonomice, în termeni de relații numerice. Dendrograma este o reprezentare unidimensională (respectiv pe ordonată), deoarece abscisa nu are nici o semnificație

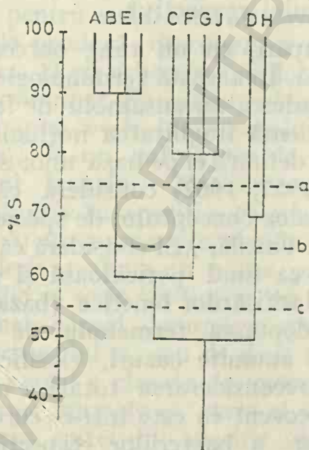


Fig. 227. — Dendrogramă reprezentînd ordinea ierarhică între tulpinile A, B, C, D, ... J, după cum rezultă din figura 226. Pe ordonată sînt înregistrate valorile coeficienților de similitudine la care fuzionează diferitele grupuri (fenoni). Liniile orizontale arbitrare, a, b și c, arată, prin intersecția lor cu liniile verticale, care sînt fenonii corespunzători coeficientului de similaritate pentru 75, 65 și 55% (după Sneath și Sokal, 1962).

specială. Ea are un aspect de arbore datorită faptului că fiecare tulpină studiată este reprezentată de o linie verticală și este plasată alături de tulpina care îi este cea mai asemănătoare (fig. 227). Liniile verticale sînt întrerupte

în partea lor de jos de linii orizontale, trasate la nivelul valorii coeficientului de asemănare a două tulpini învecinate. În felul acesta se formează fenonii cu înalt grad de similaritate. Pe măsură ce se abordează nivele de similaritate descrescîndă, fenonii iniţiali se măresc prin încorporarea altor fenoni sau tulpini rămase izolate. La un nivel de similaritate de 50% toate tulpinile sînt fuzionate într-un singur fenon. Sokal şi Sneath au propus ca fiecare fenon să fie desemnat printr-un indice, corespunzînd nivelului de similaritate deasupra căruia sînt individualizaţi fenonii respectivi. Deşi dendrograma are un aspect arborescent, nu are nici o semnificaţie filogenetică. Ilustrînd numai asemănări globale între tulpinile studiate, ea reprezintă un procedeu menit să scoată în evidenţă gradul de relaţie dintre diferitele grupuri şi ierarhizarea lor.

INTERPRETAREA DATELOR TAXONOMIEI NUMERICE. VALOAREA TAXONOMICĂ A FENONILOR

Taxonomia numerică reprezintă o metodă de clasificare perfect obiectivă şi naturală (Colobert, 1965). Problema cea mai importantă este aceea a denumirii grupurilor de microorganisme care rezultă din aplicarea principiilor ei şi, mai ales, de a stabili cărui nivel îi putem atribui în mod corect denumirea de *specie*.

Sneath şi Sokal (1962) consideră că identificarea grupelor ierarhice rezultate din taxometrie cu denumirile tradiţionale (specie, gen, trib, familie, ordin) introduce un element de subiectivitate adus de sensul tradiţional al acestor termeni. Ei propun următoarea terminologie cu definiţiile corespunzătoare:

— *Fenon* — termen referitor la orice grupare naturală pe care o putem identifica prin rangul său pe dendrogramă (adică prin gradul de asemănare existent între tulpinile aparţinînd fenonului respectiv).

— *Taxon* — corespunzînd unei grupări, cu un rang oarecare, căreia trebuie să i se acorde o valoare taxonomică. În această terminologie, un taxon va conţine cel puţin un fenon şi cel mai adesea un ansamblu de fenoni. Studiile de taxonomie numerică scot în evidenţă fragilitatea noţiunii de specie bacteriană şi pledează pentru necesitatea definirii ei pe baza unor semnificaţii biologice esenţiale. De aceea, Sneath (1957, 1962) consideră că definirea taxonului de bază — care joacă un rol analog conceptului de specie din taxonomia tradiţională este o problemă foarte dificilă. „El consideră că utilizarea termenului de „specie" trebuie evitată, ca fiind periculoasă şi recomandă pentru denumirea taxonului de bază al clasificărilor fenetice (bazate pe grupările naturale constituite din fenoni) adoptarea termenului de *pleiston*.

Véron (1965) consideră că, deşi în anumite cazuri, clasificarea obţinută prin taxonomie numerică obligă la reconsiderarea totală a raporturilor taxonomice ale anumitor specii, foarte frecvent ea este într-o corelaţie suficientă cu schemele clasice de identificare a bacteriilor respective. Astfel, fenonii pot fi consideraţi — cel mai adesea — corespunzători conceptului de taxospecie, în sensul definit de Ravin. După majoritatea datelor obţinute pînă în prezent, cînd calculul coeficientului S s-a făcut socotind numai caracterele S^+ şi *d*, fenonii avînd nivelul minim de similaritate 70—75% (nivel

optim 90%) corespund aproximativ speciei*), iar cei cu un nivel 55—60% genului din clasificările tradiționale. În cazurile în care calculul s-a făcut ținînd seama de S^+, S^- și d, nivelul de corespondență al fenonilor cu specia și genul este mai ridicat, fiind de 80 și 70%.

Cu toate limitele și imperfecțiunile sale, taxonomia numerică este considerată de mulți cercetători ca singura metodă obiectivă, care permite, clasificarea bacteriilor la nivelul taxonilor de bază, al grupelor elementare adică, în definitiv, al speciei bacteriene (Véron, 1967).

NORME GENERALE DE NOMENCLATURĂ A BACTERIILOR

Cu toate discuțiile controversate privind definirea speciei bacteriene, „Codul Internațional de nomenclatură a bacteriilor" (1966) — care prevede principiile, regulile și recomandările privind stabilirea denumirilor noi și a priorității lor — consideră drept categorie taxonomică de bază *specia* și admite următoarele categorii taxonomice principale în succesiunea lor ascendentă: *specia, genul, familia, ordinul, clasa* și *diviziunea*. Subcategoriile (subfamilie, subordin, trib) se folosesc rar.

Potrivit acestor norme, fiecare microorganism este denumit, după sistemul binominal al lui Linné, prin două cuvinte latinizate (de exemplu, *Bacillus subtilis)*, care caracterizează foarte sintetic microorganismul dat.

Primul cuvînt, care indică genul, este un substantiv la singular de origine latină, greacă sau oricare alta, dar latinizat. El desemnează anumite trăsături morfologice (*Bacillus* = baston mic; *Micrococcus* = grăunte mic; *Sarcina* = pachet), uneori asociate cu habitatul natural al bacteriei (*Lactobacillus* = bastonaș mic din lapte) sau derivat din numele unor oameni de știință (*Pasteurella* = Pasteur, *Escherichia* = Escherich). Numele genului se scrie cu inițială majusculă și poate fi prescurtat (*B. subtilis*), dacă nu se pretează la confuzii. Cel de-al doilea cuvînt — epitetul specific — este, în general, descriptiv pentru substantivul care reprezintă genul și se referă la culoare, sursă, boala produsă, descoperitor sau orice alt element distinctiv. El poate fi, după caz: 1) un adjectiv acordat în gen cu numele generic (*Bacillus albus, Sarcina aurantiaca, Spirillum rubrum*); 2) un adjectiv în forma participiului prezent al unui verb (de exemplu, *Clostridium dissolvens*, care este capabil să dizolve); 3) un substantiv la genitivul posesiv (*Streptococcus lactis*, streptococul laptelui; *Diplococcus pneumoniae*, diplococul pneumoniei); 4) un substantiv în apoziție, cu rol explicativ (*B. radicicola*, care trăiește pe rădăcini); 5) un nume propriu, în cazul genitiv (*Proteus rettgerii*) sau un adjectiv derivat dintr-un nume propriu (*Clostridium pasteurianum*). Epitetul specific se scrie totdeauna cu inițială mică și nu se prescurtează.

În unele cazuri, denumirea speciei este urmată de un singur nume, acela al descoperitorului ei, sau de două nume, al celui care i-a dat primul numele și al celui care l-a clasat: de exemplu, *Micrococcus luteus* Schroeter (Cohn). În alte cazuri, numele ca atare al descoperitorului lipsește, fiind folosit pentru formarea epitetului specific, de exemplu: *Cl. welchii* (Migula) Holland, descoperit de Welch, denumit de Migula în onoarea acestuia și plasat în sis-

---

*) Nivelul fenonilor care corespund speciilor este fixat prin referință la nomenspeciile cunoscute.

tematică de Holland. Pentru speciile de bacterii, ca și pentru plante și animale, se folosesc două feluri de denumiri, care trebuie bine diferențiate: numele științific, acceptat internațional (*Mycobacterium tuberculosis*) și numele comun sau vernacular (bacilul tuberculozei, bacilul lui Koch etc.).

Unitatea practică de lucru este tulpina bacteriană (engl. = strain, fr. = souche, germ. = Stamm). Tulpina bacteriană este o cultură pură a unei specii provenind din descendenții unei singure izolări din mediul natural. În mod obișnuit, ea este denumită adăugîndu-se la numele de specie numele persoanei care a făcut izolarea, al localității, un număr sau un alt semn convențional de laborator. Spre exemplu, *E. coli* K 12.

CATEGORII INFRASPECIFICE

Unele specii sînt subdivizate în subspecii sau varietăți cu denumiri latine. De exemplu, *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (varietate provenită de la om). Codul Internațional de nomenclatură bacteriană stabilește o serie de subdiviziuni sau taxoni infrasubspecifici reprezentați de una sau mai multe tulpini din aceeași specie, care posedă una sau mai multe proprietăți deosebite și pot fi tratate ca un subgrup taxonomic. Termenul de infrasubspecific este utilizat cu referire la taxonii inferiori subspeciei. Codul recomandă caracterizarea lor prin adăugarea sufixului *-var* sau *-form* (tabelul nr. 42).

Tabelul nr. 42

Diviziunile inferioare subspeciei bacteriene (taxonii infrasubspecifici)

Denumirea recomandată	Denumirea de evitat	Proprietățile la care se referă
Biovar	Biotip Tip fiziologic	Proprietăți biochimice și fiziologice
Chemovar	Chemotip	Producerea unei anumite substanțe chimice
Chemoform	Chemotip	Constituția chimică
Cultivar	—	Proprietăți speciale de cultivare
Morfovar	Morfotip	Caractere morfologice
Patovar	Patotip	Proprietate specială pentru una sau mai multe gazde
Fagovar	Fagotip Lizotip	Sensibilitate la anumiți fagi
Serovar	Serotip	Caractere antigenice evidențiate prin reacții serologice
Stare	—	Variații tip colonii S, R etc., care pot fi definite antigenic (serovar)
Forma specialis	Forma specială	Simbiotic, comensal, parazit pentru o anumită gazdă

Genul reprezintă un grup taxonomic format din mai multe specii înrudite cu specia tip. El poate fi format dintr-o singură specie (gen monotipic) sau, obișnuit, din mai multe specii.

Familia este un grup format din mai multe genuri înrudite, dintre care unul este denumit *genul tip*. Numele de familie se formează de la numele genului tip + sufixul *-aceae* adăugat la rădăcina numelui generic. De exemplu: *Bacillus — Bacillaceae; Spirochaeta — Spirochaetaceae.*

Ordinul este constituit dintr-un grup de familii înrudite și este denumit prin substituirea cu sufixul *-ales* a sufixului *-aceae* din numele familiei tip: *Spirochaetaceae — Spirochaetales.*

Clasa este un grup taxonomic format din mai multe ordine înrudite.

Diviziunea (Phyllum) este constituită dintr-un grup de clase înrudite.

SISTEMELE DE CLASIFICARE A BACTERIILOR

Din cauza dificultăților menționate în definirea conceptului de specie bacteriană nu există un acord unanim privind un sistem unitar de clasificare a acestor organisme. Ca urmare, au fost elaborate mai multe sisteme de clasificare (Hauduroy, 1953; Krasilnikov, 1959; Prévot, 1957, 1961; Skerman, 1967), reflectînd punctele de vedere ale autorilor respectivi, în adunarea materialelor studiate și în efortul de a le potrivi cît mai mult unor scopuri practice.

Lucrarea cea mai amplă și mai larg folosită, determinatorul lui Bergey, ediția a opta (1974), deși este ca și celelalte mai curînd un dicționar sau catalog decît un tratat de clasificare, conține descrierile speciilor acceptate, în general, în acord cu normele Comitetului Internațional de nomenclatură. Cu toate imperfecțiunile sale, legate de faptul că unele descrieri se referă la caractere puțin numeroase și adesea diferite de la o specie la alta, fapt care limitează efectuarea de comparații, el reprezintă, pentru cei mai mulți bacteriologi, un instrument util în uniformizarea studiilor. Această ediție abandonează ideea unei ierarhizări bazată pe relații naturale sau evolutive și grupează lumea bacteriilor pe criterii pur practice, stabilite pe caractere ușor determinabile, atribuind diferitelor grupări denumiri vernaculare. Această optică ilustrează lipsa unor argumente solide pe care s-ar putea baza un arbore filogenetic construit logic, deși foarte multe particularități ultrastucturale, fiziologice, biochimice și chiar genetice indică relații de înrudire filogenetică, chiar între unii taxoni superiori. În preambulul aceleiași lucrări, editorul principal, R.G.E. Murray, propune gruparea bacteriilor în regnul *PROCARYOTAE*, cu două diviziuni:

Diviziunea I — Procariote fototrofe (partea 1) *(Photobacteria)*

Clasa I. Fotobacteriile albastre-verzi *(Cyanobacteria)*

Clasa II. Fotobacteriile roșii

Clasa III. Fotobacteriile verzi

Diviziunea II — Procariote indiferente față de lumină *(Scotobacteria)*.

Clasa I. *Bacteria* (care include 16 părți): 1) Bacteriile care se mișcă prin alunecare („Gliding bacteria"); 2) Bacteriile prevăzute cu teci; 3) Bacteriile care înmuguresc și cele cu prelungiri celulare; 4) Spirochetele; 5) Bacteriile încurbate și spiralate; 6) Cocii și bacilii Gram-negativi, aerobi; 7) Bacilii Gram-negativi, facultativ anaerobi; 8) Bacteriile Gram-negative anaerobe; 9) Cocii și cocobacilii Gram-negativi; 10) Cocii Gram-negativi, anaerobi; 11) Bacteriile Gram-negative, chemolitotrofe; 12) Bacteriile

metanogene; 13) Cocii Gram-pozitivi; 14) Cocii şi bacilii sporulaţi; 15) Bacilii Gram-pozitivi, asporogeni; 16) Actinomicete şi bacterii înrudite.

Clasa II. Scotobacterii obligate intracelulare în celule eucariote (*Rickettsia* şi *Chlamydia*).

Clasa III. Scotobacterii fără perete celular — *Mollicutes (Mycoplasma)*.

CRITERIILE DE IDENTIFICARE A BACTERIILOR

Identificarea bacteriilor — una din aplicaţiile practice de importanţă excepţională a taxonomiei — are ca scop compararea proprietăţilor unei culturi pure cu cele ale unui taxon bine caracterizat*). Cînd această comparare evidenţiază diferenţa dintre cele două entităţi, taxonul respectiv capătă o identitate nouă, este descris ca atare, denumit în acord cu Codul Internaţional de nomenclatură a bacteriilor şi propus pentru validare forului internaţional căruia îi revine această misiune. Identificarea şi clasificarea bacteriilor trebuie să folosească în mod obligatoriu un număr cît mai mare de caractere distinctive de ordin morfologic, biochimic, fiziologic, antigenic, ecologic etc., uşor de observat şi relativ stabile, independent de modificările mediului. În identificarea unei bacterii trebuie să se ţină seama, în special, de caracterele unitare, adică de acelea asupra cărora nu poate exista echivoc şi care nu se prezintă sub forme intermediare (de exemplu, sporogeneza, fermentarea unui anumit zahar). Caracterele neunitare, care exprimă nivelul cantitativ al unei activităţi a microorganismului (de exemplu, cantitatea de alcool sau de acid produsă prin fermentarea unui substrat), nu sînt indicate drept criterii de clasificare.

Se va evita practicarea unui număr excesiv de teste, preferîndu-le pe cele care respectînd condiţiile menţionate se efectuează rapid şi simplu. Deoarece bacteriile izolate direct de la animale, plante sau alte medii naturale (sol, apă etc). sînt rar în culturi pure, o etapă premergătoare efectuării testelor de identificare este izolarea lor în culturi pure (axenice), respectiv lipsite de prezenţa altor microorganisme.

Caracterele morfologice şi tinctoriale (formă, cili, capsulă, spori etc., respectiv, colorabilitatea cu coloranţi de anilină, reacţia Gram etc.) reprezintă un criteriu preliminar, necesar pentru plasarea unei tulpini necunoscute într-o subdiviziune primară, deoarece asemenea caractere nu pot diferenţia între ele specii înrudite. În unele cazuri însă, ele pot fi utilizate în practică drept un prim criteriu de diagnostic (de exemplu, prezenţa bacilului tuberculozei în sputa unui bolnav). Cercetările efectuate în ultimii ani asupra ultrastructurii şi mai ales asupra structurii moleculare a unor constituenţi celulari, aşa cum este, de exemplu, peretele celular, foarte deosebit anatomic şi biochimic în funcţie de caracterul Gram al bacteriilor, au determinat o reevaluare a semnificaţiei taxonomice a caracterelor morfologice, în special pentru studiile speciale de taxonomie.

---

*) Caracterizarea unui taxon implică obţinerea unei colecţii cît mai complete de date, care ilustrează proprietăţile unei culturi pure de bacterii, permiţînd descrierea acesteia (Tŭper şi Krämer, 1981).

Astfel, determinarea secvenței aminoacizilor în lanțurile tetra- și penta-peptidice ale peptidoglicanului a permis un număr important de revizuiri ale taxonomiei bacteriilor Gram-pozitive.

Caracterele biochimice și fiziologice furnizează un număr important de informații privind capacitatea de a utiliza anumiți nutrienți (acizi organici, alcooli sau glucide ca surse de C) de a metaboliza anumite substraturi specifice ale unor enzime (fermentația unor zaharuri, cu sau fără producere de gaze, și modificări de pH evidențiate de un indicator colorat) etc. Aceste proprietăți indică, în general, diferențe specifice de echipament enzimatic, deși unele specii foarte diferite se pot asemăna destul de mult între ele din acest punct de vedere. De asemenea, se pot obține informații privind limitele de temperatură și pH, care permit multiplicarea, reacția la presiunea osmotică, relația cu O_2 și lumina, aptitudinea de a produce anumiți metaboliți intermediari sau finali (alcooli, acizi organici, toxine etc.).

Enzimele. Caracteristicile enzimatice ale microorganismelor includ prezența sau absența enzimelor-cheie sau ale unor întregi căi metabolice fie în anumite condiții speciale, fie în toate condițiile în care sînt testate. Studiul este important pentru că furnizează informații asupra naturii substratului utilizabil ca sursă de energie și nutrient, ca și asupra produșilor de metabolism. Cea de-a doua modalitate de studiu include compararea proprietăților uneia sau mai multor enzime sub raportul mobilității electroforetice, al stabilității la căldură sau față de alți agenți inactivanți, reactivitatea lor imunologică și, în final, compararea secvenței aminoacizilor în lanțul polipeptidic și conformația moleculară a acestuia (Hartley, 1974; Williams și Shah, 1981).

Pigmenții bacterieni. Compoziția chimică a pigmenților bacterieni este importantă, în primul rînd, în cazul bacteriilor fototrofe la care studiul diferitelor bacterioclorofile poate fi utilizat pentru diferențierea taxonomică la nivel de gen a organismelor respective. De asemenea, capacitatea bacteriilor din genul *Pseudomonas* de a face sinteza unor pigmenți caracteristici (piocianină, pioverdină, piorubină și piomelanină) poate fi utilizată pentru diferențierea preliminară a tulpinilor recent izolate din natură și a speciilor din genul respectiv.

Caracterele de cultură privind aspectul macroscopic al culturilor pe medii solide (S, R, mucoide etc.) sau lichide, precum și exigențele caracteristice față de substanțele nutritive și factorii de creștere, luate izolat, constituie, de asemenea, un criteriu insuficient pentru diferențierea speciilor. Deși variază în limite largi în funcție de vîrsta culturii, de natura mediului și, în anumite limite, de temperatură și pH, aspectul culturilor efectuate pe medii standard și în condiții optime de cultivare poate furniza informații cu caracter ajutător pentru identificarea bacteriilor respective, bazate pe aspectul suprafeței și formei, pigmentarea și mărimea coloniilor, caracterul lor bombat sau plat, precum și unele aspecte mai particulare („roirea", opacitatea, mirosul etc.).

Caracterele antigenice (serologice) sînt deosebit de importante deoarece permit identificarea unui microorganism, respectiv a unui antigen, necunoscut, prin punerea lui în contact cu un anticorp cunoscut (de exemplu, un ser imun

preparat prin imunizarea unui animal cu o tulpină standard), în diferite reacţii serologice (aglutinare, precipitare, fixare a complementului etc.).

Caracterele ecologice privind habitatul natural al microorganismului şi relaţiile lui în mediul natural cu alte forme de viaţă trebuie folosite cu discernămînt la bacterii, deoarece pot varia în funcţie şi de alţi factori decît cei proprii speciei date, precum şi pentru faptul că una şi aceeaşi specie bacteriană poate trăi în medii naturale foarte diferite. Cu toate aceste rezerve, habitatul natural imprimă o serie de parametri optimi, ecologici, utili pentru caracterizarea unor specii (temperatura optimă de creştere sau de patogenitate, temperatura tolerată, intensitatea luminii, pH, simbioză cu unele microorganisme (de exemplu, la *Rhizobium*) etc. Caracterele ecologice au o deosebită importanţă taxonomică la virusuri care, uneori, nu pot paraziza decît o singură gazdă sau chiar un singur ţesut sau celulă.

Caracterul de patogenitate, a cărui manifestare depinde în primul rînd de virulenţă, este, de asemenea, relativ şi neunitar deoarece, pe de o parte, virulenţa variază cu tulpina şi se poate atenua sau chiar pierde în culturi de laborator, iar, pe de altă parte, eficacitatea acţiunii patogene depinde şi de receptivitatea individuală a gazdei folosite pentru evidenţierea ei. Patogenitatea se testează prin inoculare experimentală la organisme sensibile, pe o cale adecvată. Sînt luate în consideraţie numai rezultatele pozitive, deoarece cele negative pot fi datorate fie utilizării unei gazde neadecvate, fie unor condiţii de inoculare nepotrivite. Lamanna şi Mallette (1949) citează, ca un exemplu pentru riscurile care decurg din folosirea excesivă a patogenităţii drept caracter taxonomic, cazul bacteriei *Pseudomonas aeruginosa* (*Pyocyanea*), agent patogen cunoscut la animale şi capabil să producă infecţii naturale şi la plante, în acest caz însă descris independent sub denumirea de *Pseudomonas polycolor*.

Sensibilitatea la fag, condiţionată de prezenţa unor receptori pe suprafaţa celulei bacteriene, se testează stabilind activitatea unui set standard de fagi cunoscuţi. Ea permite stabilirea de subdiviziuni în cadrul speciei (fagovar) cu importanţă în epidemiologie pentru determinarea sursei de infecţie şi a căilor de transmitere, spre exemplu, în cursul epidemiilor cu *Salmonella* (lizotipie). Tehnica are o valoare practică reală, dar limitată de faptul că numai puţini fagi sînt monovalenţi şi pot, ca atare, să servească pentru determinarea unei specii. Cei mai mulţi fagi sînt polivalenţi, deci neutilizabili în acest scop. Deoarece multe tulpini sînt lizogene, ele pot fi caracterizate prin tipizare fagică indirectă (lizogenotipie), adică prin detectarea şi identificarea fagilor temperaţi prezenţi ca profag în genomul lor.

În folosirea acestor criterii trebuie să se ţină seama de variabilitatea caracterelor corespunzătoare care, la unele bacterii, poate fi foarte mare, chiar de la o tulpină a aceleiaşi specii la alta. În general, însă, această variabilitate este caracteristică, în sensul că oscilează între anumite limite determinate în aşa fel încît, interpretate cu prudenţă, caracterele susceptibile de variaţie pot avea valoare taxonomică. Ca o conduită generală, întrucît caracterele amintite sînt asociate în mod diferit, în funcţie de specie, şi pentru a se evita riscul de eroare datorită variabilităţii unora dintre ele, este necesar ca pentru determinarea speciei bacteriene să se ţină seama de întreaga lor diversitate, folosindu-se, pe cît posibil, o gamă cît mai largă de criterii definitorii.

CHEILE DE IDENTIFICARE

Diferitele caractere necesare a fi testate în vederea identificării bacteriilor sînt prezentate sub forma unor *chei de identificare*.

Cheia cea mai cunoscută, elaborată de Skerman și publicată în determinatorul lui Bergey — dealtfel destul de dificil de folosit — conține enumerarea caracterelor constante („caractere-cheie") prezente sau absente totdeauna la un taxon dat. Inițial se determină prin observație sau experimental caracterele bacteriei de studiat, după care se consultă cheia pentru a răspunde la întrebările din ea. Răspunsul posibil este *da* sau *nu* (cheie dihotomică). Caracterele-cheie pozitive sînt considerate markeri sau caractere de diagnostic. Cheile de identificare permit utilizatorului să compare asemănarea oricărei bacterii izolate cu organismele deja descrise în determinator și în cazul unor deosebiri nete necesitatea acordării statutului de specie nouă.

COLECȚIILE DE CULTURI

Apărute ca o consecință a nevoilor diferitelor laboratoare de cercetare, de analize sau industriale, de a beneficia pentru activitățile lor de culturi de microorganisme controlate, colecțiile de culturi s-au dezvoltat la diferite nivele de organizare (laborator, institut, industrie sau național, în acest ultim caz afiliate la o federație internațională). Colecțiile naționale reunesc fie în culturi, fie înregistrate în evidență bacterii, microfungi (levuri și mucegaiuri), alge, protozoare, precum și celule animale, cu utilizare medicală, veterinară, genetică și biotehnologică. Rolul lor este de a păstra și furniza culturi pure autentice, de interes trecut, prezent și viitor, de a asigura caracterizarea lor și menținerea stabilității lor genetice.

Pentru fiecare specie microbiană nou recunoscută se recomandă păstrarea unei culturi pure a tulpinii tip originare, cu o descriere completă, care să poată fi completată și/sau corectată cu noi caractere, pe măsură ce tehnicile de investigare se perfecționează, în cel puțin o colecție, de la care poate fi obținută. Ea poartă denumirea colecției și un număr care trebuie citat în publicațiile lucrărilor în care a fost utilizată. Dacă tulpina este pierdută, se recomandă înlocuirea ei cu o tulpină *neotip*, care îi seamănă foarte mult. Cu foarte rare excepții însă, păstrarea unui *„specimen tip practicabil"* (cultură pură care poate fi menținută îndelungat, fără vreo schimbare semnificativă a caracterelor sale) este foarte dificilă.

Menținerea tulpinilor bacteriene în colecții se face pe mai multe căi: 1) prin transfer activ (în subculturi efectuate la intervale fixe, în funcție de particularitățile biologice ale speciei respective); 2) prin uscare (pe diferite suporturi inerte ca nisip, silicagel etc.); 3) prin liofilizare (uscare în vid precedată de congelare la temperaturi joase — 30 → — 80°C), sau 4) prin crioprezervare la — 70 → — 90°C, care asigură nivelul maxim de stabilitate și de supraviețuire în timp.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

BALCH, W. E., 1982, *Methanogens: Their impact on our concept of procaryote diversity*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., C_3, 295–303.

BARON, L. S., GEMSKI, P. Jr., JOHNSON, E. M., WOHLHIETER, J. A., 1968, *Intergeneric bacterial matings*. Bacteriol. Rev., **32**, 362–369.

BISSET, K. A., 1962, *The phylogenetic concept in bacterial taxonomy*. Symposium of the Society for General Microbiology. XII. „Microbial classification", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 362–373.

BRADLEY, S.G., 1966, *Genetics in applied microbiology*. Adv. Appl. Microbiol., **8**, 29–59.

BUCHANAN, R. E., 1965, *A focus on the meaning of bacterial species*. International Bulletin Bacteriology, Nomenclature and Taxonomy, **15**, 25–32.

CAIN, A.J., 1962, *The evolution of taxonomic principles*. Symposium of the Society for General Microbiology. XII. „Microbial Classification", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 1–13.

COWAN, S.T., 1955. *The principles of microbiol classification. Introduction in the philosophy of classification*. J. Gen. Microbiol., **12**, 314–321.

COWAN, S. T., 1962, *The microbial species — a macromyth?* Symposium of the Society for General Microbiology. XII. „Microbial Classification", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 433–455.

COWAN, S.T., 1965, *Principles and practice of bacterial taxonomy. A forward look*. J. Gen. Microbiol., **39**, 143–153.

COWAN, S.T., STEEL, K. Y., 1965, *Manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge Univ. Press, Londra.

COWAN, S.T., 1970, *Heretical taxonomy for bacteriologists (Alice in Taxonomyland)*. J. Gen. Microbiol., **61**, 145–154.

COWAN, S.T., HOLT, J. G., LISTON, J., MURRAY, R.G.E., NIVEN, C.F., RAVIN, A. W., STANIER, R.Y. (eds.), 1974, *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, ed. a 8-a, Williams & Wilkins Co., Baltimore, S.U.A.

DE LEY, R., 1968, *Molecular biology and bacterial phylogeny*, În *Evolutionary biology*, vol. 2, DOBZHANSKY, T., HECHT, M. K., STEARK, W. C. (eds.), North Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 103–156.

DODSON, E. O., 1971, *The kingdoms of organisms*. Syst. Zoology, **20**, 265–281.

FLOODGATE, G.D., 1962, *Some remarks on the theoretical aspects of bacterial taxonomy*. Bacteriol. Rev., **26**, 277–291.

FOX, G.E., MAGRUM, L. J., BALCH, W. E., WOLFE, R. S., WOESE, C.R., 1977, *Classification of methanogenic bacteria by 16 S ribosomal RNA characterization*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), **74**, 4 537–4 541.

GIBBONS, N. E., MURRAY, R. G. E., 1978, *Proposals concerning the higher taxa of bacteria*. International J. System. Bacteriol., **28**, 1–6.

GRIFFITHS, G. C. D., 1974, *On the foundations of biological systematics*. Acta Biotheoretica, **23**, 85–131.

HILL, L. R., 1976, *Advances in bacterial taxonomy*. În *Selected topics in clinical bacteriology*, DE LAURIS, T. (ed.), Ballière Tindall, Londra.

HILLABY, J., 1961, *Taxonomy: a neglected science*. New Scientist, **9**, 413–416.

JACOB, F., WOLMAN, E. L., 1961, *Sexuality and the genetics of bacteria*, Academic Press, New York.

JONES, D., SNEATH, P.H.A., 1970, *Genetic transfer and bacterial taxonomy*. Bacteriol. Rev., **34**, 40–81

KANDLER, O., SCHLEIFER, K. H., 1980, *Systematics of bacteria*. În *Progress in botany*, Springer Verlag, Berlin, **42**, 234–247.

KIRSOP, B., 1983, *Culture collections — their services to biotechnology*. Trends in Biotechnology, **1**, 4–8.

LANNI, F., 1960, *Genetic significance of microbial DNA composition*. Perspectives in Biology and Medicine, **3**, 418–432.

LURIA, S. E., 1963, *Molecular and genetic criteria in bacterial classification*. În *Recent Progress in Microbiology*, VIII, GIBBONS N. E. (ed.), University Toronto Press, Toronto, p. 604–616.

MANDEL, M., 1963, *New approaches to bacterial taxonomy: perspectives and prospects*. Ann. Rev. Microbiol., **23**, 239–274.

MARMUR, J., SCHILDKRAUT, C. L., DOTY, P., 1961, *The reversible denaturation of DNA and its use in studies of nucleic acid homologies and the biological relationships of microorganisms*. J. Chim. Physiol., **29**, 945–955.

MARMUR, J., 1962, *The relationship of the properties of DNA to problems of bacterial taxonomy*. Bull. N.Y. Acad. Med., **38**, 364–389.

MARMUR, J., FALKOW, S., MANDEL, M., 1963, *New approaches to bacterial taxonomy*. Ann. Rev. Microbiol., **17**, 329–372.

MAYR, E., 1968, *The role of systematics in biology*. Science, **159**, 595–599.

MARGULIS, LYNN, 1980, *Phyla for bacteria. The origin of life and evolution*. Alan R. Liss Inc., p. 87–95.

MEYNELL, E., 1964, *The significance of bacteriophage in bacterial classification. A review*. J. Gen. Microbiol., **36**, 461–469.

MURRAY, R. G. E., 1974, *A place for bacteria in the living world*. În *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, ed. a 8-a, BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. (eds.), Williams & Wilkins Co., Baltimore, S.U.A.

RAVIN, A. W., 1960, *The origin of bacterial species. Genetic recombination and factors limiting it between populations*. Bacteriol. Rev., **24**, 201–220.

SHAEFFER, P., 1958, *La notion d'espèce d'après les recherces récentes en génétique bactérienne*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), **94**, 167–178.

SKERMAN, V. B. D., 1963, *Design and purpose in classification*. În *Recent Progress in Microbiology*. VIII. GIBBONS N.E. (ed.), University Toronto Press, Toronto, p. 592–598.

SKERMAN, V. B. D., 1967, *A guide to the identification on the genera of bacteria*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

SNEATH, P. H. A., 1962, *The construction of taxonomic groups*. Symposium of the Society for General Microbiology, XII. ,,Microbial classification". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 289–332.

SNEATH, P. H. A., 1964, *New approaches to bacterial taxonomy. Use of Computers*. Ann. Rev. Microbiol., **18**, 335–346.

SNEATH, P. H. A., 1974, *Phylogeny of microorganisms*. Symposium of the Society for General Microbiology. XXIV. ,,Evolution in the Microbial World", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 64–75.

SNEATH, P. H. A., 1978. *Identification of microorganisms*. În *Essays in Microbiology*. NORRIS, J.R., RICHMOND, M. H. (eds.), The Gresham Press, Old Woking, Surrey, p. 1–32.

SNEATH, P. H. A., 1978, *Classification of microorganisms*. În *Essays in Microbiology*. NORRIS, J. R., RICHMOND, M. H. (eds.), The Gresham Press, Old Woking, Surrey, p. 1–31.

SOKAL, R. R., SNEATH, P. H. A., 1963, *Principles of numerical taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco.

SOKAL, R. R., 1974, *Classification: Purposes, Principles, Progress, Prospects*. Science (S.U.A), **185**, 1 115– 1 123.

SONEA, S., 1971, *A tentative unifying view of bacteria*. Rev. Canad. Biol., **30**, 239–244.

SONEA, S., PANISSET, M., 1976, *Pour une nouvelle bactériologie*. Rev. Canad. Biol., **35**, 103–167.

SONEA, S., PANISSET, M., 1980, *Introduction à la nouvelle bactériologie*. Les presses de l'Université de Montréal.

STANIER, R. Y., 1961, *La place des bactéries dans le monde vivant*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), **101**, 297–312.

VERON, M., 1964, *L'orientation actuelle de la classification bactérienne.* Pathol. Biologie, **12**, 605–618.
WAKSMAN, S. A., 1957, *Species concept among the Actinomyces with special references to the genus Streptomyces.* Bacteriol., Rev., **21**, 1–30.
WHITTAKER, R. H., 1969, *New concepts of kingdoms of organisms,* Science (S.U.A.), **163**, 150–160.
WHITEHEAD, P.J.P., 1972, *The contradiction between nomenclature and taxonomy.* Syst. Zoology, **21**, 215–224.
WILSON, E. O., 1968, *Recent advances in Systematics,* BioScience, **18**, 1 113–1 117.
ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală,* Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti.
ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generală,* vol. I., Edit. Academiei, Bucureşti.
ZUCKERKANDL, P., PAULING, L., 1965, *Molecules as documents of evolutionary history,* J. Theoret. Biol., **8**, 357–366.

ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA MICROORGANISMELOR

„Marea dificultate, astăzi, nu este evoluția din momentul în care a existat ceva viu. Cel mai greu este de precizat cum s-a ajuns la prima celulă. Aceasta creează probleme absolut diabolice".

F. JACOB

VÉRON, M., 1964, *L'orientation actuelle de la classification bactérienne*. Pathol. Biologie, 12, 603–618.

WAKSMAN, S. A., 1957, *Species concept among the Actinomycetes with special reference to the genus Streptomyces*, Bacteriol. Rev. 21, 1–29.

WHITTAKER, R. H., 1969, *New concepts of kingdoms of organisms*, Science (S.U.A.), 163, 150–160.

WILKINSON, P. J. H., 1972, *The confusion between nomenclature and taxonomy*. Syst. Zoology 21, 215–

WILSON, E. O., 1965, *Recent advances in Systematics*, Bi., Science 15, 1113–1117.

ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală*, Edit. didactică și pedagogică, București.

ZAVADIL, G., 1953, *Tratat de microbiologie generală*, vol. I., Edit. Academiei, București.

ZUCKERKANDL, E., PAULING L., 1965, *Molecules as documents of evolutionary history*, J. Theoret. Biol., 8, 357–366.

ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA MICROORGANISMELOR

(Pl. 57—64)

Problema originii și evoluției organismelor vii — una dintre cele mai interesante și mai disputate probleme ale biologiei contemporane — a fost relativ neglijată o perioadă de timp de către microbiologi — pornind de la ideea că microorganismele au un potențial de evoluție neobișnuit de rapid, care face imposibilă trasarea unor genealogii, și de la faptul că evoluția a fost considerată de pe pozițiile biologiei moleculare, ca o colecție nu prea interesantă de accidente istorice. În ultimii ani însă, această problemă a revenit în atenția multor cercetători, care au formulat o serie de ipoteze, menite să explice apariția primelor organisme și evoluția lor pînă la diversitatea formelor de viață înregistrate de biologia contemporană. Dominate inițial de doctrina generației spontane sau a abiogenezei, concepțiile asupra originii vieții au fost schimbate fundamental de Spallanzani (1749) și mai ales de Pasteur (1861), care a demonstrat imposibilitatea apariției spontane a unor forme de viață în condițiile experiențelor sale și în stadiul actual al istoriei Pămîntului.

Problema actuală a originii vieții constă în a încerca să se explice modul în care au apărut, probabil spontan, primele forme de viață, în condițiile atît de diferite ale Pămîntului primitiv, admițînd că perioada respectivă nu a fost prea îndelungată. Deși asupra cronologiei diferitelor evenimente din istoria Pămîntului și a vieții există puncte de vedere diferite, în general se consideră că vîrsta Universului este de ~12 miliarde de ani (Dicke, 1962), formarea crustei solide a Pămîntului s-a produs acum ~ 4,6—5 miliarde de ani (Tilton și Steiger, 1965), iar evoluția biologică a început acum ~ 3,8—4 miliarde de ani. Ipotezele actuale asupra originii vieții (Wald, 1954; Ehrensvard, 1962; Calvin, 1969; Fox, 1967; Eigen, 1971 etc.) se bazează în mare parte pe concepțiile lui Oparin (1924) și Haldane (1928), după care condițiile cu totul particulare prezente în momentul formării Pămîntului și după aceea au permis producerea pe cale abiotică a unor substanțe chimice organice și anorganice și a unor reacții, care, final, au determinat apariția unor molecule capabile de autoasamblare și replicare, ca rezultat al proprietăților lor fizice și chimice. Calvin (1969, 1975), încercînd să reconstituie etapele anterioare apariției primului sistem biologic consideră, pe baza datelor furnizate de chimia actuală, că evoluția biologică a fost precedată de formarea elementelor chimice și de evoluția chimică (fig. 228).

După Dickerson (1978), evoluția celulelor vii din materia neanimată s-ar fi făcut în cinci faze succesive: 1) formarea planetei și a atmosferei, cu elementele cele mai simple (H, C, N etc.) ale spațiului interstelar, care au

servit pentru construcţia moleculelor organogene; 2) sinteza monomerilor biologici (aminoacizi, zaharuri, baze organice etc.); 3) polimerizarea monomerilor în lanţuri primitive de proteine şi acizi nucleici, în mediul apos; 4) segregarea „picăturilor" lui Haldane din „supa" primitivă în *protobionţi* dotaţi cu o chimie şi o identitate proprie şi 5) dezvoltarea unui anumit tip de „maşinărie" reproductivă, capabilă să asigure tuturor celulelor vii aceeaşi capacitate de metabolism ca şi celulele parentale.

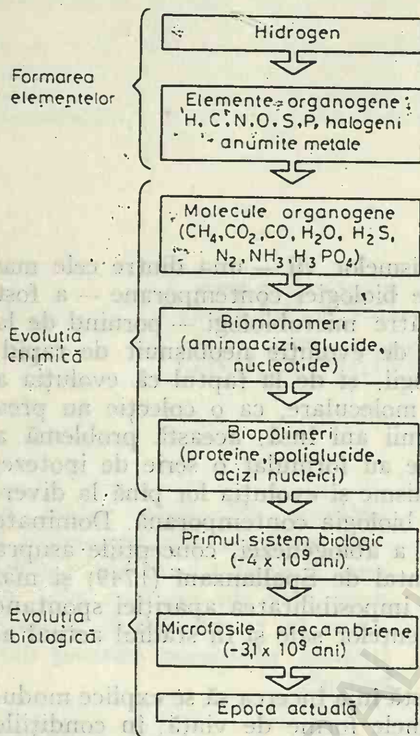


Fig. 228. — Etapele formării elementelor şi ale evoluţiei chimice şi biologice, după concepţia lui Calvin (1975).

PERIOADA EVOLUŢIEI CHIMICE

După datele actuale, evoluţia chimică a început într-un univers dominat de hidrogen, care prin reacţii de fuziune a dat naştere elementelor superioare şi, în special, celor organogene sau biogene (C, N, S, P, O, halogeni şi Fe). Pornind de la aceste elemente, şi de la compuşii anorganici din atmosferă, în prima perioadă a evoluţiei chimice prebiotice s-au format moleculele organogene (CH_4, CO_2, CO, H_2O, H_2S, N_2, NH_3, PO_4H_3 etc.). Ulterior, sub acţiunea diferitelor surse de energie existente (radiaţii UV, descărcări electrice, lumină solară, cenuşi vulcanice, unde de şoc etc.), a avut loc conversia lor — tot pe cale abiogenă — într-o serie de biomolecule monomere primordiale (aminoacizi, zaharuri, baze nucleice etc.), unităţile de construcţie ale copolimerilor (proteine, acizi nucleici, polizaharide). După Eigen (1981) au mai contribuit la producerea de molecule organice, sub acţiunea radiaţiilor solare, materialele ultrareci provenite din meteoriţi şi comete, aflate în cantităţi foarte mari. În evoluţia ulterioară a atmosferei Pămîntului, paralel cu apariţia unor compuşi mai oxidaţi (de exemplu, CO), s-a înregistrat o scădere a concentraţiei H_2, dar, după toate datele, în momentul apariţiei vieţii, oxigenul era încă absent şi atmosfera neobişnuit de reducătoare. Se admite că suprafaţa pămîntului avea o compoziţie foarte asemănătoare celei actuale, sub raportul prezenţei şi bogăţiei elementelor constitutive, dar, probabil, foarte diferită sub raportul capacităţii lor de a forma diferite combinaţii.

Ipotezele actuale asupra originii vieţii, care includ adeseori puncte de vedere contradictorii, sînt bazate în mare măsură pe o serie de deducţii, decurgînd din cunoştinţele actuale de biochimie, şi pe o serie de cercetări experimentale, care au urmărit evoluţia moleculelor simple, în condiţii de laborator, ce reproduceau fizicochimia Pămîntului primitiv sau aşa-numita chimie prebiotică. Pe această bază, s-a ajuns la concluzia că apariţia vieţii

nu este rezultatul unei întîmplări, ci o consecinţă logică a unor principii chimice cunoscute, care au acţionat asupra constituenţilor Pămîntului primitiv şi a unor fenomene, care ascultă de legile evoluţiei generale a Universului. Procesul a depins, în mare măsură, de evoluţia progresivă a compuşilor carbonului şi a sistemelor deschise multimoleculare formate de ei (Oparin şi Gladilin, 1980).

Teoria evoluţiei chimice prebiologice a fost confirmată de cercetările experimentale ale lui Urey şi Miller (1953, 1955), precum şi ale lui Ponnamperuna şi colab. (1968, 1975), care au demonstrat că, practic, cele mai multe substanţe organice — monomeri sau polimeri — pot fi formate abiotic, în medii care simulează condiţiile din atmosfera primitivă a Pămîntului. Utilizînd substraturi simple (CO, CO_2, H_2O, H_2, CH_4, NH_3) au fost obţinuţi o serie de produşi primari (acid cianhidric, dicianamidă, acid formic, formaldehidă, aldehidă glicolică şi acid acetic) şi o serie de produşi secundari de tipul acidului succinic, glicocolului, alaninei, acidului aspartic ş.a. În acest scop, Miller şi Urey au utilizat un dispozitiv simplu, care permitea recircularea unui amestec de gaze (CH_4, H_2 şi NH_3) şi apă într-un balon de sticlă în care se produceau descărcări electrice puternice ($\sim$ 60 000 v), imitînd efectele fulgerelor. După cîteva zile, $\sim 20\%$ din carbonul total era convertit în molecule organice de tipul aminoacizilor. Ulterior s-a demonstrat posibilitatea de obţinere pe această cale a celor mai mulţi aminoacizi naturali, a zaharurilor, bazelor purinice şi pirimidinice, nucleozidelor şi nucleozidfosfaţilor, porfirinelor, acizilor lactic, propionic, acetic etc. Cei mai importanţi reactanţi intermediari sînt formaldehida, acidul cianhidric şi cianoetilena, care împreună cu NH_3 şi apa permit sinteza constituenţilor proteinelor şi acizilor nucleici, deci a biomoleculelor legate de structura şi funcţia aparatului genetic. Fazele următoare includ succesiv producerea de biopolimeri, evoluţia structurilor şi apariţia catalizei (capacitatea de a face reacţii specifice cu un grad înalt de eficienţă) şi, final, procesul de formare şi stocare a informaţiei. Sursele de energie utilizate au fost, în afară de descărcările electrice, iradierile cu UV, radiaţiile ionizante, energia termică (18 ore la autoclav sau 3 ore la 200°C) sau lumina solară (Lemmon, 1975). În condiţii naturale, în atmosfera primitivă s-au adăugat razele cosmice, radioactivitatea, căldura provenită din erupţiile vulcanilor şi impactul meteoriţilor (Ponnamperuna şi Gabel, 1974).

EVOLUŢIA PREBIOLOGICĂ

Perioada cea mai puţin cunoscută este aceea a organizării edificiilor biochimice prebiologice şi trecerea de la molecular la supramolecular, care precede apariţia organismelor primitive. Ea presupune asamblarea, interacţiunea complexelor prebiologice (polipeptide, polizaharide, polinucleotide), formarea de complexe multimoleculare, edificarea membranelor etc. După Eigen şi colab. (1981), „supa" primordială a inclus nu numai biomonomerii consideraţi în prezent ca reactanţi biochimici esenţiali, ci şi o cantitate enormă de molecule chimic posibile, dar „rele" din punct de vedere biologic. Din acest ansamblu, foarte complex şi variat, de molecule utile şi inutile, un factor organizator, a cărui natură biochimică este încă ignorată, a acţionat foarte selectiv pentru a favoriza activitatea monomerilor utilizaţi în mod obişnuit în sinteza polimerilor biologici.

IPOTEZA LUI OPARIN

Elaborată într-o formă inițială în anul 1924 și dezvoltată ulterior în numeroase lucrări, pe baza unor cercetări experimentale, ipoteza lui Oparin acordă un rol important apariției în oceanul primitiv a coacervatelor (l. coacervo = a aduna la un loc, a îngrămădi), globule microscopice cu Ø de 1,0 µm — 500 µm, alcătuite din polimeri suspendați într-un mediu bogat în apă. Coacervatele pot fi formate experimental cu diferite combinații de polimeri biologici, ca, de exemplu: „proteine — proteine" (histone + albumine), „proteine — carbohidrați" (histone — gumă arabică) sau „proteine — acizi nucleici" (histone — ADN sau histone — ARN), mimînd diferite tipuri de reacții chimice care au putut lua naștere sub influența forțelor naturale. Unele coacervate apar delimitate de mediul înconjurător printr-o îngroșare cu aspect membranar. Unele din aceste picături microscopice au capturat un catalizator primitiv, probabil un polipeptid, și diferite molecule de substrat de tipul aminoacizilor sau zaharurilor. Acest tip de „picături" dotate cu un „metabolism" simplu au putut interacționa cu mediul apos înconjurător și, ca urmare, au încorporat noi produși, mărindu-și volumul. Cînd ajung o anumită limită de mărime, determinată de considerații de ordin fizic, picătura se rupe în picături mai mici așa cum o emulsie groasă de ulei în apă se poate dispersa într-o emulsie fină, prin agitare. Unele picături mici rețin moleculele de catalizator, derivate din picătura parentală și pot „crește" o nouă generație de picături.

Dickerson (1978) a ilustrat această proprietate importantă a coacervatelor (caracteristică sistemelor bifazice) de a concentra preferențial, într-o fază sau alta, substanțele a căror solubilitate în cele două faze este diferită. Astfel, experimental, s-a demonstrat că picăturile de coacervate, alcătuite din polizaharide și proteine, concentrează enzima *fosforilaza*, atunci cînd aceasta este prezentă în mediul înconjurător. Dacă se adaugă în mediu glucozo-1-fosfat, acesta difuzează în picături unde este polimerizat, prin acțiunea fosforilazei, la amidon. Energia pentru polimerizare este luată

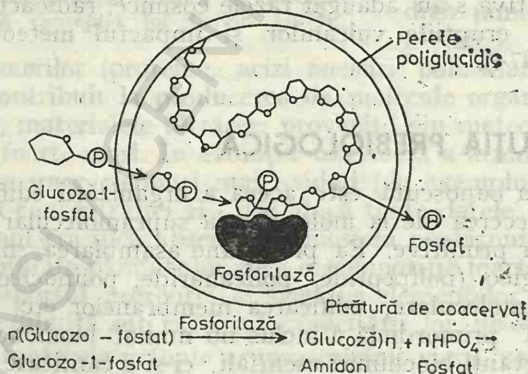


Fig. 229. — Polimerizarea glucozo-1-fosfatului la amidon, sub acțiunea fosforilazei în interiorul unei picături de coacervat (după Dickerson, 1978).

din legătura fosfat a glucozo-1-fosfatului, cu eliberare de fosfat anorganic în mediu, ca produs al reacției (fig. 229). Amidonul determină îngroșarea peretelui și mărirea volumului picăturii, care ajungînd la o anumită dimensiune are tendința să se fragmenteze spontan în mai multe picături-fiice.

Cele care preiau molecule de fosforilază, continuă să crească, dar cu o rată mai mică, deoarece cantitatea iniţială de enzimă este dispersată între mai multe picături. În cazul în care printr-un mecanism oarecare unele coacervate ar putea îngloba sau produce mai multe molecule de fosforilază, ele se pot comporta ca protoorganisme autoperpetuabile, cu ,,metabolism" energetic într-o singură treaptă (de tipul celui descris), care, deşi rudimentar, le permite totuşi să ,,supravieţuiască", să crească şi să se ,,multiplice".

Acest gen de experienţe, care demonstrează nu numai proprietăţile coacervatelor, ci şi posibilităţile lor de evoluţie spre sisteme protobionte, au fost reproduse şi în variante mai complicate. Spre exemplu, în cazul coacervatelor care înglobează două enzime (fosforilază şi amilază), prima enzimă polimerizează glucozo-1-fosfatul la amidon, iar cea de-a doua îl degradează la maltoză. Coacervatul nu mai creşte pentru că amidonul este degradat pe măsură ce este format, iar maltoza şi fosfatul difuzează în mediul înconjurător (fig. 230).

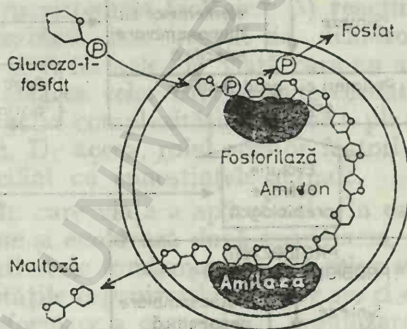


Fig. 230. — Reacţie în două trepte în interiorul unei picături de coacervat, avînd ca rezultat polimerizarea glucozo-1-fosfatului, la amidon, sub acţiunea fosforilazei şi degradarea acestuia de către amilază, cu producere de maltoză, care difuzează din picătura de coacervat în mediu (după Dickerson, 1978).

Coacervatul devine, după Dickerson (1978), o ,,mică fabrică" în care are loc dimerizarea glucozei la maltoză, utilizînd energia din legătura glucozo-1-fosfatului. Experienţe similare au demonstrat capacitatea sintezei de acid poliadenilic prin includere de ARN-polimerază şi ADP în coacervate formate din histone şi ARN, precum şi realizarea unor secvenţe elementare ale transportului de electroni sau ale fotosintezei. În general, se admite că stabilizarea coacervatelor se poate face conferindu-le un tip de metabolism primitiv. Formarea coacervatelor din polimeri nespecifici şi proprietăţile lor de simulare a unor reacţii ale metabolismului celular, după încorporarea de substraturi şi enzime din mediu, explică posibilitatea formării în condiţiile oceanului primitiv a structurilor supramoleculare numite ,,protobionte" sau ,,eobionte", care au fost, probabil, punctul de plecare al evoluţiei ce a dus la apariţia reacţiilor caracteristice vieţii (Oparin, 1972).

După o versiune recentă a lui Oparin şi Gladilin (1980), viaţa a apărut la relativ puţin timp după formarea planetei Pămînt. Evoluţia chimică a compuşilor organici a avut drept rezultat sinteza abiogenă a oligomerilor şi polimerilor liberi. Acestei faze i-a urmat perioada evoluţiei prebiologice, în cursul căreia oligomerii şi polimerii cu grad mic de organizare s-au autoasamblat nespecific pentru a da naştere unor sisteme termodinamic des-

chise, caracterizate, pe lîngă individualitatea structurală, de apariția unor funcții catalitice prebiologice, numite *probionți primitivi* sau *protobionți*. Studiul experimental al probionților creați artificial în laborator, sub

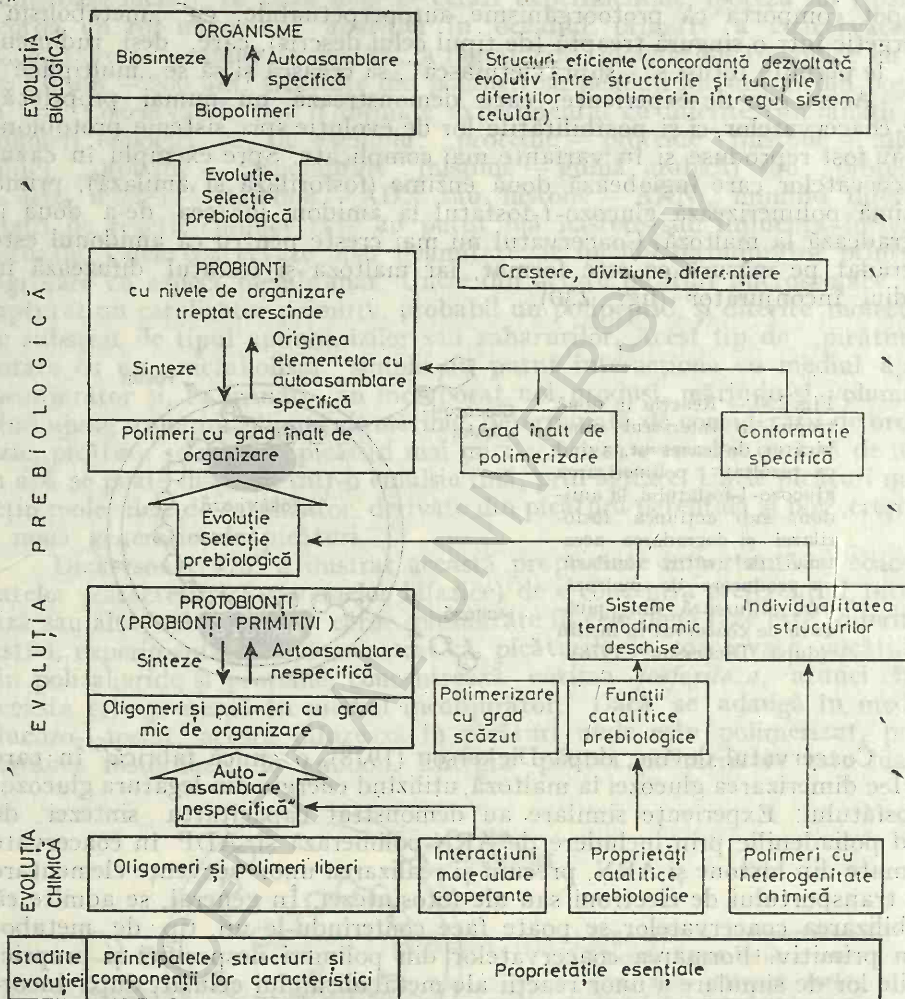


Fig. 231. — Schema evoluției probionților și a apariției primelor organisme vii (după Oparin și Gladilin, 1980).

forma unor complexe insolubile de macromolecule (picături de coacervate), a demonstrat capacitatea lor de diferențiere individuală, și de evoluție, pe baza selecției naturale, spre un nivel superior de organizare, cu grad ridicat de conformație specifică și cu capacitatea de tranziție spre o autoasamblare specifică a structurilor componente (fig. 231). Apariția probionților și originea vieții au fost asociate cu dobîndirea unui nivel mai ridicat de organizare și, în consecință, cu dezvoltarea unor legi noi biologice, suprapuse legilor fizice și chimice (Oparin și Gladilin, 1980).

Noua lege apărută în faza evoluţiei prebiologice — legea selecţiei naturale — absentă în lumea anorganică, a determinat apariţia unor trăsături proprii sistemelor biologice: 1) capacitatea de a contracara creşterea entropiei; 2) apariţia unei organizări teleonomice, ca rezultat al adaptării structurii şi funcţiei sistemelor vii, în parte şi ca întreg, la un mediu dat şi 3) emergenţa unui mecanism de transfer al informaţiei tipic vieţii, care determină apariţia unei proprietăţi esenţiale, ereditatea, şi asigură posibilitatea evoluţiei spre o transformare a protobionţilor în sisteme biologice primitive.

Critica ipotezei lui Oparin. Woese (1979) consideră că „tezele lui Oparin sînt inexacte atît în presupunerile lor de bază, cît şi în concluziile lor majore" şi că „problema nu se pune să le modificăm, ci să le înlocuim". Argumentele sale sînt următoarele: 1) în concepţia lui Oparin, evoluţia vieţii s-a realizat pe o cale fundamental nebiologică, în care sistemele vii care au apărut sînt doar periferic conectate cu procesele care le-au dat naştere; 2) radiaţiile UV, descărcările electrice, temperaturile ridicate ş.a. sînt surse de energie distructive pentru sistemele biologice; 3) reacţiile biochimice fundamentale, în general vorbind, sînt reacţii de dehidrogenare şi ele nu pot avea loc într-un ocean şi 4) formele de viaţă care au apărut sînt în esenţă distructive pentru organizarea celor care le-au precedat şi nu au contribuit prin ele înşile la construcţia complexităţii chimice a planetei, pînă în momentul apariţiei fotosintezei. De aceea, rolul acestor factori în geneza unor celule vii este greu de conciliat cu cunoştinţele actuale.

După Woese (1979), modul în care viaţa a apărut este, în esenţă, acelaşi cu modul în care ea se menţine şi evoluează după apariţia sa, iar stările prebiologice trebuie să posede atributele fundamentale ale celor vii, pentru că aceste atribute nu sînt proprietăţile organismelor vii *per se*, ci caracteristicile unui proces general de transformare a energiei în organizare. El consideră că rolul luminii solare în perioadele prebiotice a fost mult mai mare decît cel de a încălzi planeta. Lumina vizibilă a fost sursa primară a proceselor energetice, iar centrii de absorbţie ai luminii au reprezentat punctele focale ale chimiei şi organizării prebiotice. După concepţia sa, nu lipsită de aspecte contradictorii, originea vieţii nu poate fi concepută ca un eveniment improbabil, necesitînd o serie de etape neverosimile şi atît de prelungite sau ca o acumulare de compuşi în oceanul primitiv. El consideră că unele condiţii de sinteză prebiotice au putut fi mai severe decît se presupune în prezent şi că fotoreacţiile în spectrul vizibil au avut o importanţă insuficient luată în seamă în ipotezele actuale. De aceea, Woese, recunoscînd caracterul incomplet al schemei sale privind originea vieţii, admite că rolul şi valoarea sa constau în „a forţa ideea existenţei unei alternative autentice şi originale faţă de oparinism".

Barbieri (1981), asociindu-se în mare măsură acestor critici, consideră ipoteza lui Oparin ca un exemplu de lamarckism molecular. El o încadrează între teoriile fenotipice, care au la bază axioma fundamentală că originea vieţii a precedat originea eredităţii, respectiv replicarea a precedat ereditatea: primele „picături" de proteine au produs descendenţi şi au căpătat capacitatea de a face un fel de replicare. Informaţia biologică a fost transferată iniţial de la proteine la proteine şi ulterior de la proteine la acizi nucleici. Raţiunea istorică a teoriilor fenotipice decurge, după Barbieri, din faptul că

anterior descoperirii lui Avery (1944), proteinele erau considerate ca substratul eredității și, ca urmare, informația și structurile biologice se exprimau prin proteine.

IPOTEZA LUI FOX

Cunoscută sub denumirea de *ipoteza proteinoidelor* (1967, 1973), se bazează, în principal, pe unele cercetări de laborator și diferă de aceea a lui Oparin, în special prin comportarea polipeptidelor formate pe cale prebiotică. Fox a obținut polimeri, numiți *proteinoide*, prin policondensarea termică anhidră pe lavă sau nisip silicios a unor amestecuri de aminoacizi, după cîteva ore, la 130—180°C, sau după perioade mai îndelungate, la 50—60°C, în prezența polifosfaților. Deoarece au multe proprietăți în comun cu proteinele produse pe cale biologică, proteinoidele pot fi considerate ca precursori prebiotici ai proteinelor sau *protoproteine* (Fox, 1980, 1981). Proteinoidele au o g.m. de ~ 20—25 000 dal și conțin 18 aminoacizi diferiți, uniți prin legături polipeptidice, într-o așezare ordonată a monomerilor, în funcție de compoziția amestecului utilizat.

Experiența demonstrează că protoproteinele parțial ordonate au putut apărea fără existența unui mecanism complex de codificare, de tipul celui utilizat de microorganismele actuale. Lăsată să se răcească, în condiții corespunzătoare de pH și concentrație ionică, suspensia concentrată de proteinoide formează spontan *microsfere*, cu diametrul de 1,5—3 µm (aproximativ 1 miliard/gram), avînd la microscopul electronic un aspect similar bacteriilor sferice actuale. Microsferele sînt delimitate de o membrană dublă, constituită probabil — în absența lipidelor — prin interacțiunea dintre resturile aminoacizilor hidrofili și hidrofobi ai proteinoidelor. Această modalitate de organizare este interpretată de Fox ca ilustrînd proprietățile de autoorganizare ale unui tip primitiv de polimeri sintetici, similari proteinelor care pot forma entități structurale, asemănătoare celulelor cele mai primitive. Microsferele proteinoide au un mod de comportare dinamic, similar unor celule: își modifică corespunzător forma, în mediu hipo- și hipertonic, fapt care sugerează existența unei funcții de membrană semipermeabilă, pot să crească pe seama proteinoidelor din mediu, pot fi induse să se dividă, prin modificări de pH sau ale concentrației de $MgCl_2$; lăsate în repaus 1—2 săptămîni încep să formeze *muguri*, care se detașează pentru a forma a doua generație de microsfere.

Datele lui Fox (1973, 1980) și Eigen (1981) demonstrează că microsferele proteinoide pot exercita funcții enzimatice. Ele pot cataliza descompunerea glucozei, pot exercita activități esterazice și peroxidazice, fapt care sugerează posibilitatea apariției întîmplătoare a enzimelor specifice din astfel de polimeri ordonați, ca rezultat al îmbunătățirii treptate a așezării lanțurilor laterale, donatoare și receptoare de electroni, la situsurile active.

După Fox (1973), microsferele ar purta informație, deoarece sînt formate din proteinoide care au o compoziție în aminoacizi neîntîmplătoare și ar putea reprezenta o etapă majoră în evoluția informației genetice, datorită faptului că informația proteinoidelor ar fi putut fi utilizată pentru selecția polinucleotidelor. Experimental s-a demonstrat că proteinoidele bazice, bogate în lizină, se asociază selectiv cu homopolinucleotide de tip poli-C și poli-U, nu însă și cu poli-A sau poli-G. În schimb, proteinoidele bogate în

arginină se asociază selectiv cu poli-A sau poli-G. Aceste date sugerează ipoteza că proteinoidele purtătoare de informaţie chimică primitivă au avut capacitatea de a o transmite unor acizi nucleici primitivi, în aşa fel încît la baza apariţiei codului genetic ar sta specificitatea interacţiunilor dintre anumite proteinoide şi polinucleotide.

În concepţia lui Fox (1980, 1981), proprietatea esenţială a proteinoidelor este capacitatea lor de a se organiza rapid într-un număr imens de *protocelule*, capabile de „metabolism", creştere şi reproducere, într-un mod foarte diferit de cel actual. Rolul lor în evoluţia formelor de viaţă actuale ar fi fost corelat cu producerea protocelulelor, care, prin dobîndirea sistemelor producătoare de energie şi a codului genetic, ar fi devenit celulele actuale (fig. 232). În felul acesta, reproducerea la nivel macromolecular (replicarea ADN) a fost numai „un rafinament evolutiv tardiv" (Fox, 1973), odată cu care replicarea şi-a pierdut caracterul aleator.

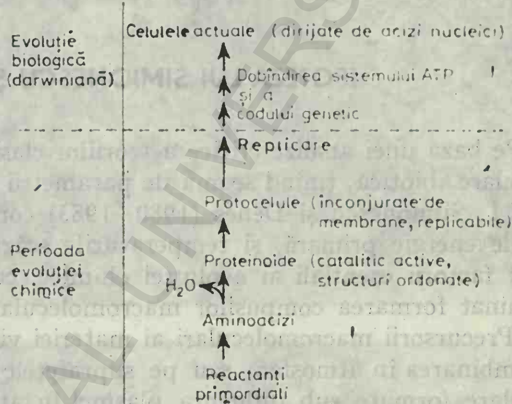


Fig. 232. — Ipoteza lui Fox privind originea celulelor capabile de reproducere (prioritatea proteinelor ca molecule informaţionale).

Experienţele lui Oparin şi Fox au meritul de a ilustra conceptul de selecţie chimică pentru supravieţuire şi gradul în care factorii fizicochimici pot determina o comportare care mimează viaţa şi influenţează evoluţia, înainte de apariţia moleculelor care stochează informaţia. Ele demonstrează că formarea de coacervate sau microsfere (proteinoide) este o comportare comună a polimerilor în soluţie, că aceste microsisteme nu sînt deopotrivă de stabile şi că probabilitatea supravieţuirii lor este mărită dacă dobîndesc capacitatea de a efectua reacţii simple, care consolidează bariera faţă de lumea înconjurătoare. Este posibil că oceanul primitiv era supraaglomerat cu „picături" de acest gen, posesoare de reacţii speciale, care supravieţuiau în timp, după care erau din nou dispersate. Acele picături care prin pură întîmplare conţineau catalizatori — „capabili să inducă polimerizări utile" — au supravieţuit mai mult decît altele. Probabilitatea de supravieţuire a fost direct legată de complexitatea şi eficienţa „metabolismului" lor. Acesta a fost singurul tip de selecţie naturală şi evoluţie care a existat anterior dezvoltării moleculelor care stochează informaţia genetică.

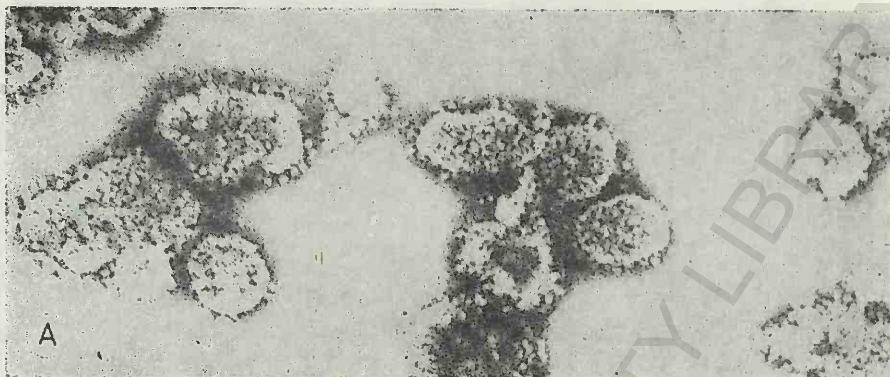
De-a lungul a multe milioane de ani au fost selecţionate acele „picături” care aveau capacitatea intrinsecă de a prelua molecule şi energie din mediul înconjurător, de a le încorpora în substanţe care stimulează supravieţuirea nu numai a picăturilor „parentale”, ci şi a celor „fiice”, în care „părinţii” se dispersează cînd ating dimensiuni prea mari. Se ajunge la o formă de organizare şi manifestare care nu reprezintă viaţa, dar ceva foarte apropiat. Singurul element care le lipseşte este un mecanism de ordine, capabil să asigure tuturor „picăturilor-fiice” setul de catalizatori necesari pentru a putea efectua toate reacţiile importante pentru supravieţuirea lor, respectiv aparatul genetic. Este probabil că odată formaţi, acizii nucleici au avut capacitatea de replicare în mediul primitiv ca o proprietate inerentă a structurii lor şi că cel puţin o parte din ei au exercitat funcţii catalitice, care au avut drept ultimă consecinţă propria lor replicare şi acumulare mai rapidă. Ulterior, dintre toate formele de cuplare a acizilor nucleici cu substanţele din mediu cea mai eficientă a fost cuplarea cu polipeptidele, pentru că prin evoluţie a dus la apariţia codului genetic (Calvin, 1976).

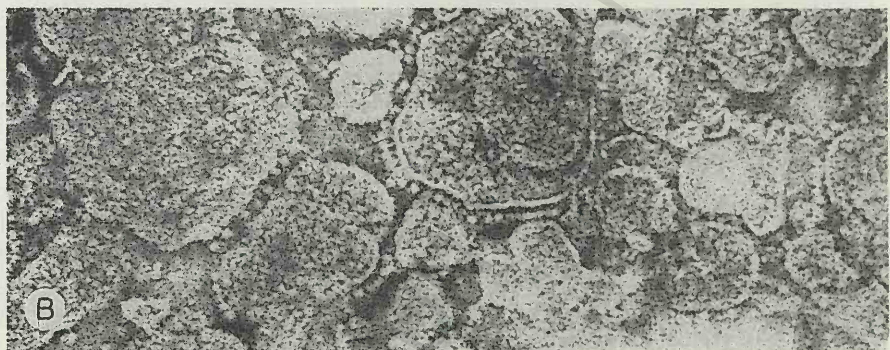
IPOTEZA LUI SIMIONESCU ŞI DÉNES

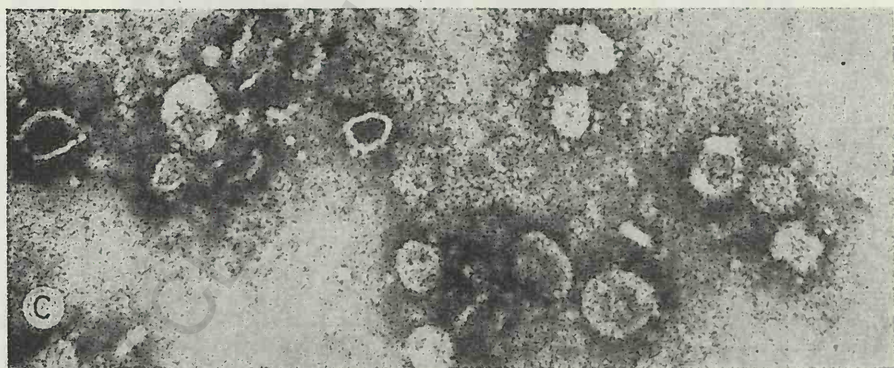
Pe baza unei analize critice a teoriilor clasice şi a experienţelor proprii de simulare abiotică, ţinînd seama de parametrii Pămîntului în epoca respectivă, C.I. Simionescu şi Dénes (1980, 1983) consideră că plasma rece*), ca sursă de energie primară, şi temperaturile scăzute (între −50 şi −60°C), au fost factorii esenţiali ai evoluţiei chimice, care acţionînd convergent au determinat formarea compuşilor macromoleculari din gazele atmosferei primare. Precursorii macromoleculari ai materiei vii au apărut prin acumularea şi recombinarea în atmosferă sau pe suprafeţele reci ale solului a unor specii moleculare formate sub influenţa plasmei în atmosfera primară. Formarea protobiopolimerilor structurali şi funcţionali s-a realizat prin mecanisme de recombinare, în timpul procesului de topire a gheţii. Datele experimentale sugerează că principalii componenţi cu semnificaţie biologică (polipeptide, polizaharide etc.) cu structură macromoleculară i-au precedat cronologic pe cei cu mase moleculare mici (aminoacizi, glucide, baze), formaţi prin mecanisme de hidroliză sau de descompunere. Trecerea de la amestecurile chimice la sistemele organizate *(protocelule)* s-a realizat prin autoasamblarea amestecurilor de protobiopolimeri în edificii ordonate supramoleculare. Pe baza a numeroase rezultate experimentale proprii, au elaborat un model original de evoluţie a originii vieţii, conform „teoriei la rece” (fig. 233), care deschide perspectiva reproducerii în laborator a protocelulelor cu funcţii enzimatice şi de autoasamblare.

---

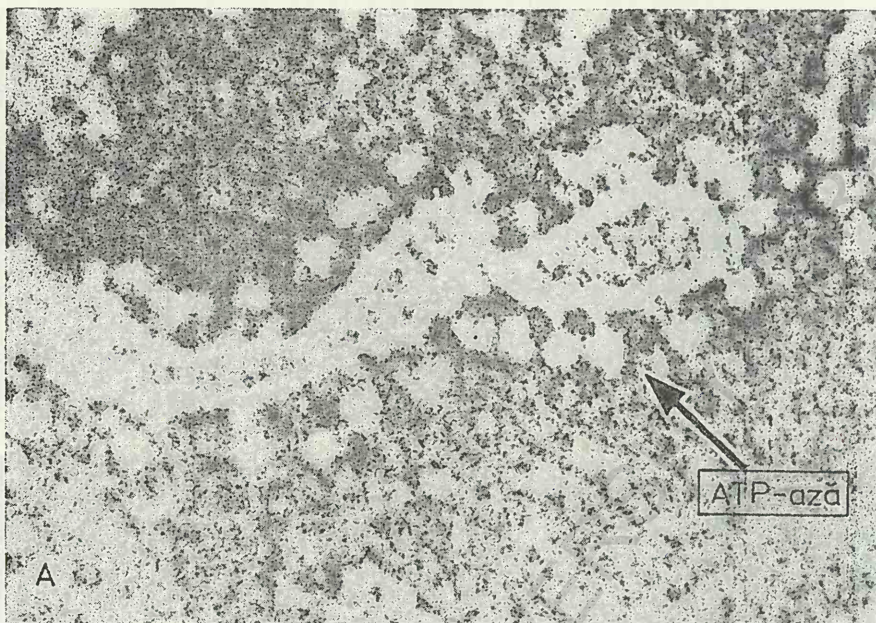
*) Considerată ca a patra stare de agregare a materiei, *plasma* reprezintă un amestec de două „gaze”, unul atomic sau ionic, iar celălalt electronic. Fiecare dintre ele se găsesc, separat, în stare de echilibru şi este caracterizat printr-o temperatură proprie. *Plasma rece* este obţinută în prezent numai în laborator, în tuburi electronice cu descărcări în gaze, în care „gazul” electronic are o temperatură mult mai mare decît „gazul” atomic sau ionic. De aceea, aceste gaze nu se află în echilibru termodinamic, plasmele respective numindu-se neizoterme.

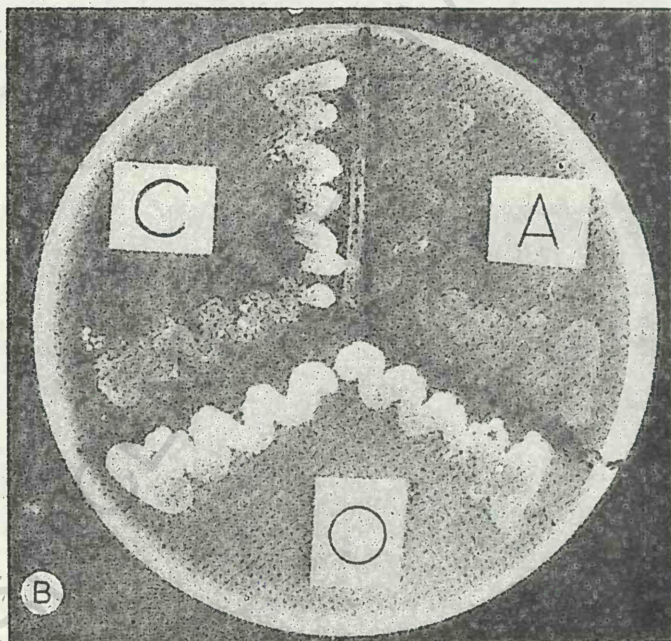




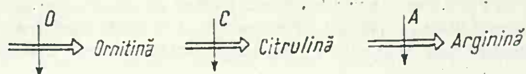


Pl. 1—Vezicule de membrane obținute din membrane interne mitocondriale (A), de cloroplaste vegetale (B) și din membrana citoplasmatică a *E. coli* (C). Pe suprafața lor se observă structuri „în buton" corespunzînd ATP-azei. Ele proemină în mod normal la exterior numai în cazul cloroplastelor. În imagine sînt îndreptate spre exterior și în cazul mitocondriilor și al bacteriilor deoarece membranele s-au rupt și au format vezicule avînd fața internă spre exterior (după Hinkle și colab., 1978).



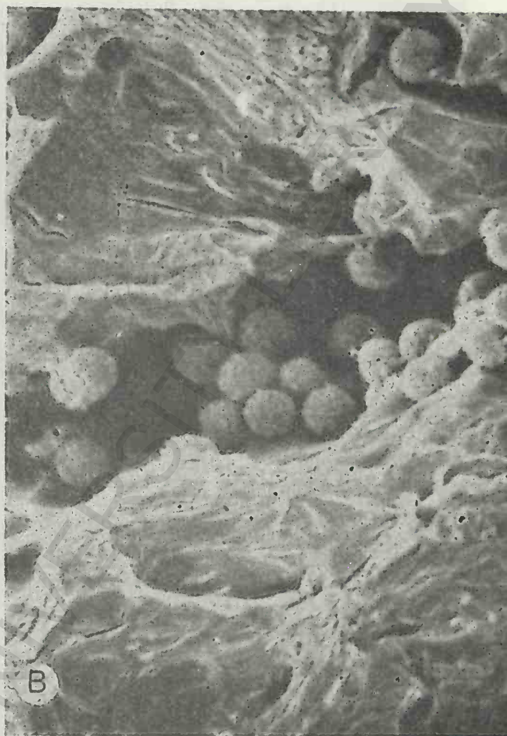


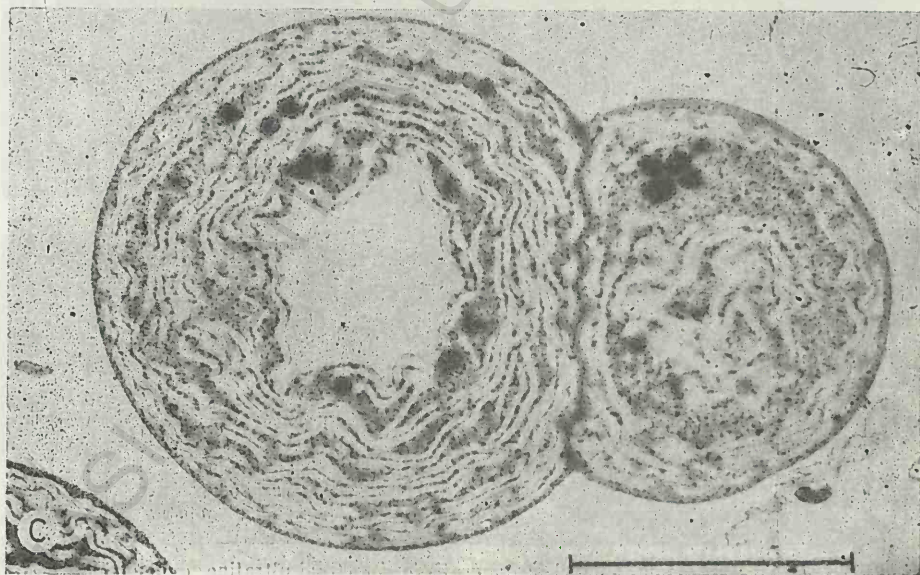
Pl. 2 — A. Aspectul morfologic al ATP-azei legată de membrana mitocondrială (microelectronografie, după Lipmann, 1975).
B. Fenomenul de hrănire încrucișată între bacterii cu mutații în aceeași cale de sinteză. Mutantele sînt notate în funcție de enzima pe care nu o mai pot sintetiza:



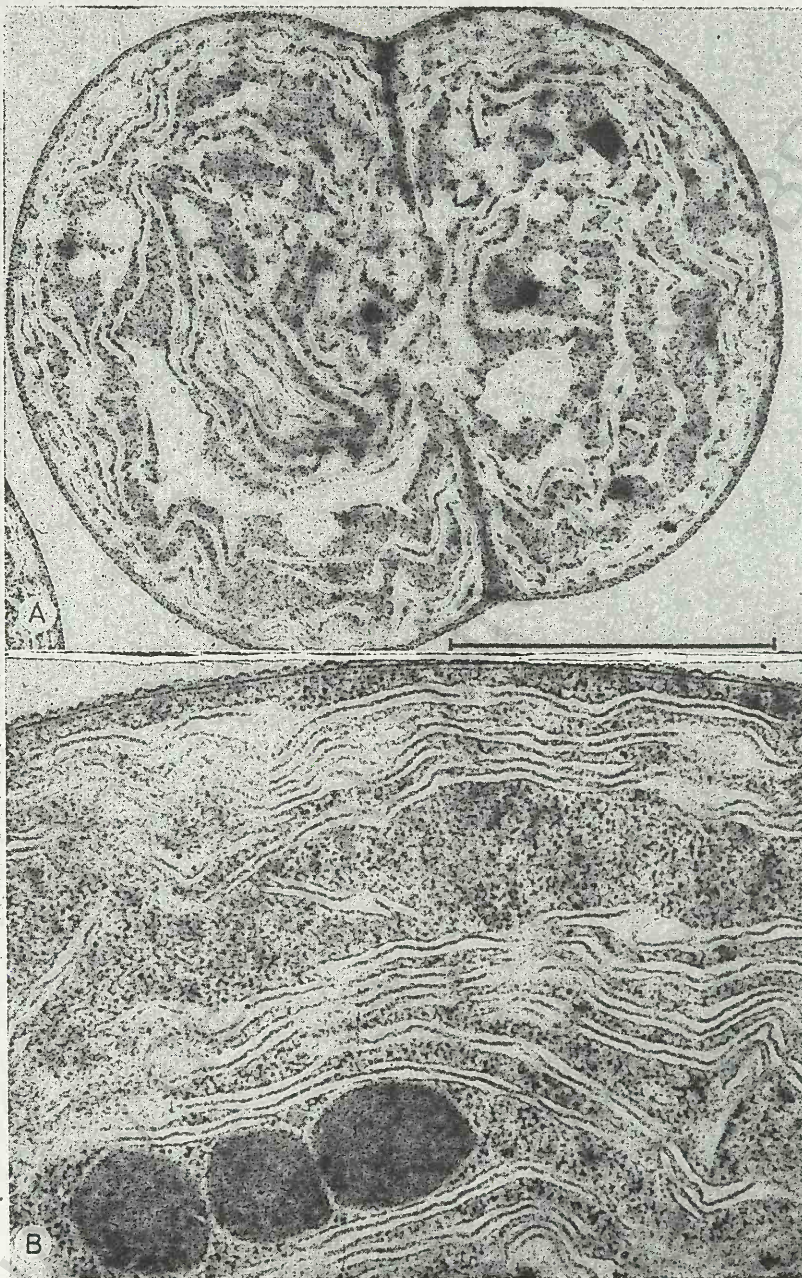
Mutanta A care crește slab pe un mediu ce conține urme de arginină stimulează creșterea mutantelor adiacente C și O. Mutanta C stimulează în mod similar pe O, dar nu și pe A (după Davis, 1969).



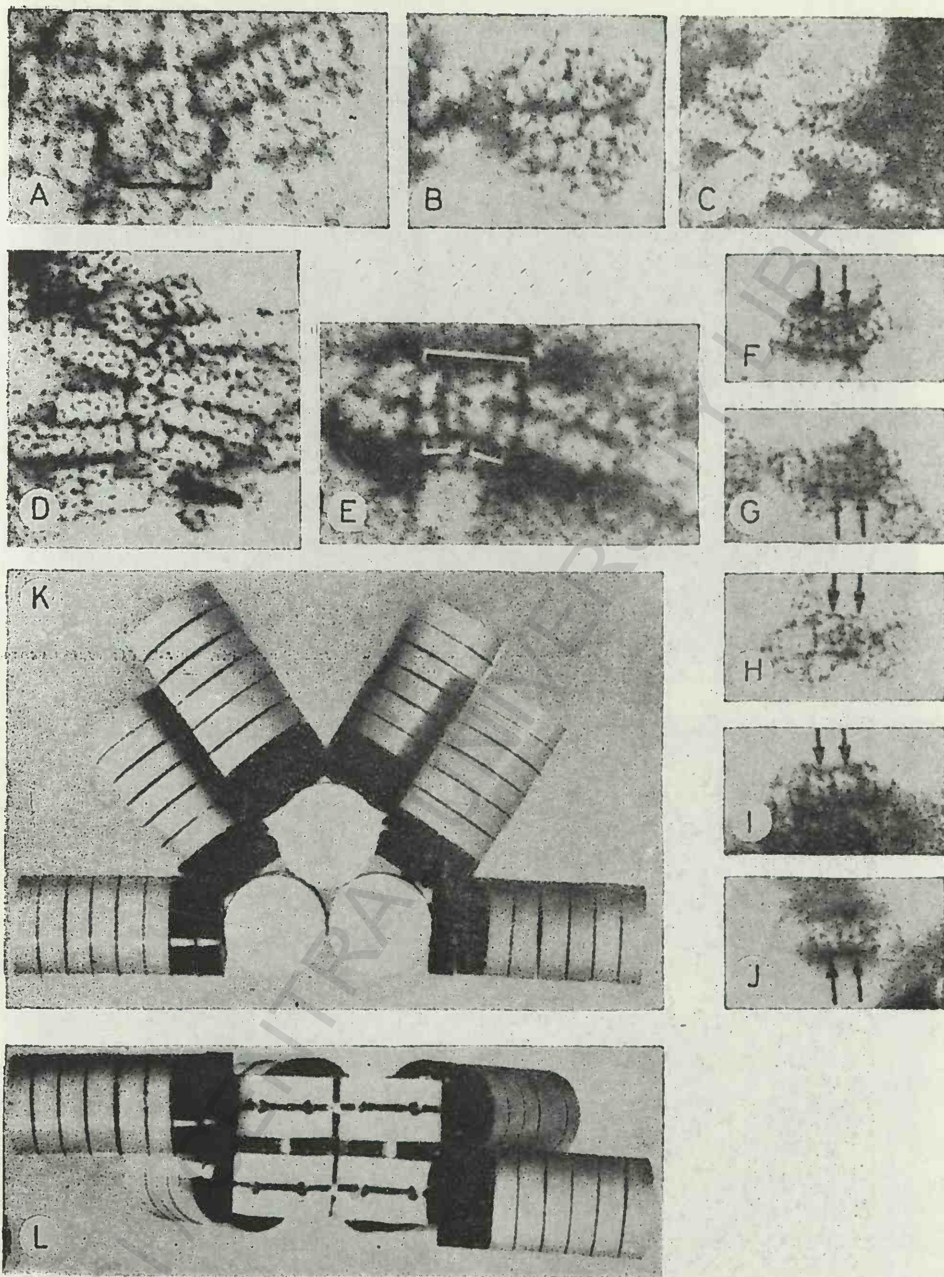




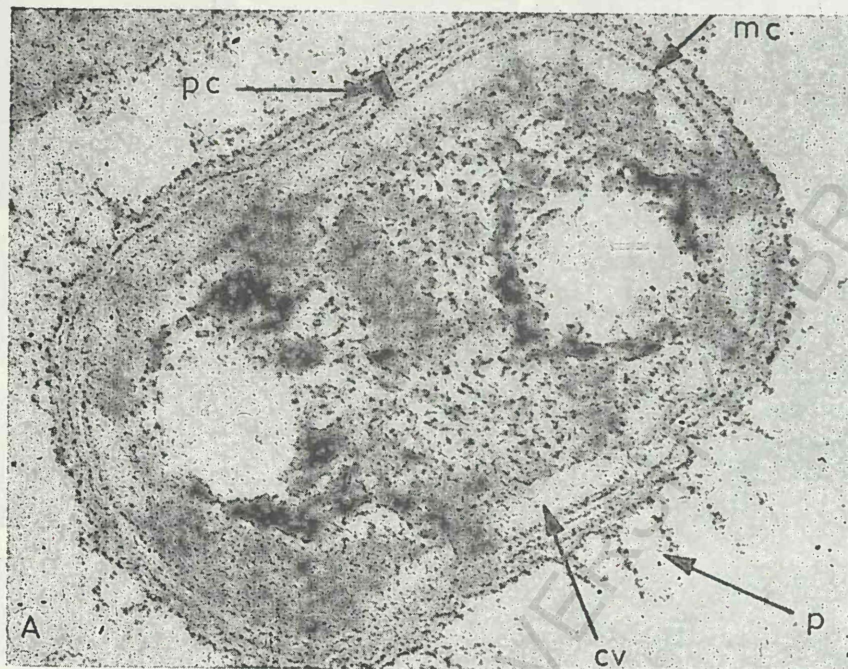
Pl. 3—A, B. *Prochloron*: celule situate în adînciturile regiunii orale la *Didemnum carneolentum*. Microelectronografie în scanning (după Lana Cheng, 1981). C. Diviziunea celulară la *Prochloron* prin creşterea centripetă a peretelui celular. Bara =5 μm. Microelectronografie (după Kit W. Lee, 1981).

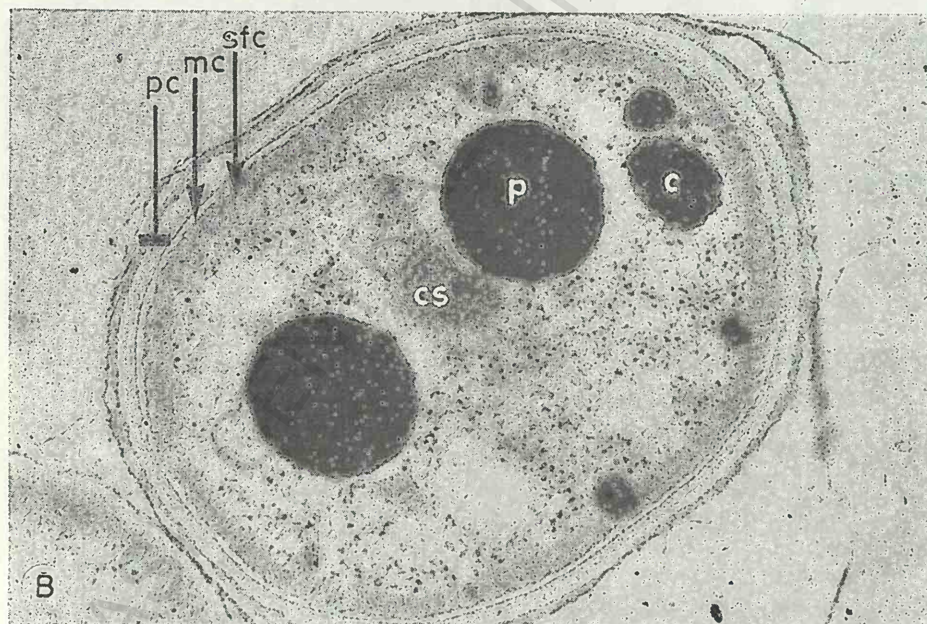


Pl. 4 — A. *Prochloron*. Microelectronografia unei secţiuni ultrafine, evidenţiind diferenţierea centroplasmei şi a cromoplasmei, precum şi prezenţa corpilor poliedrici. Bacteria este pe cale de diviziune prin creşterea centripetă a peretelui celular. B. *Prochloron*, porţiune din aceeaşi celulă, evidenţiind peretele celular multistratificat, tilacoizii aşezaţi în perechi şi corpii poliedrici. Bara=5 μm (după Kit W. Lee, 1981).



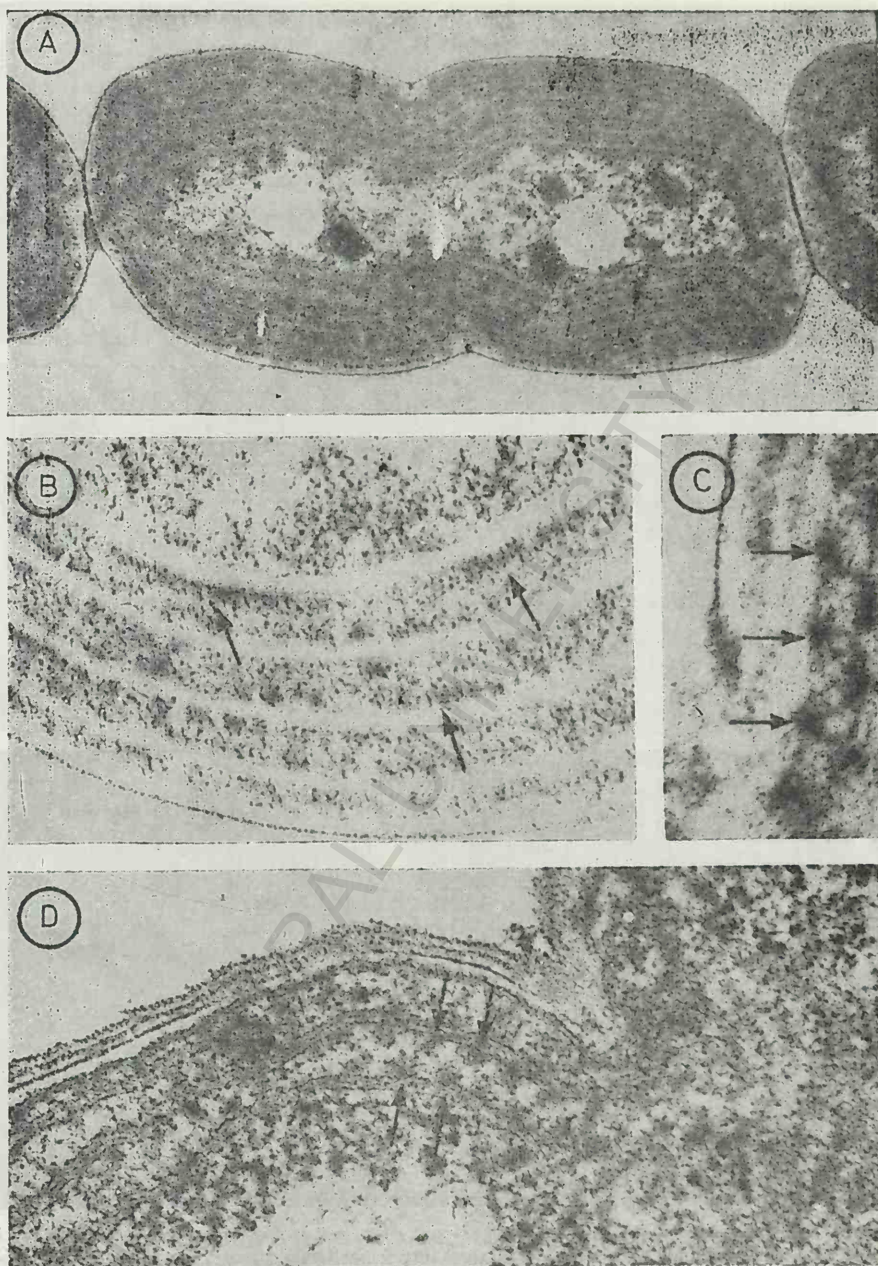
Pl. 5 — A — J. Structura ficobilisomilor izolaţi de la cianobacteria LPP—7409 şi *Synechocystis*, evidenţiind diferite detalii de structură (după Bryant şi colab., 1979). K.L. Modelul de structură al ficobilisomilor hemidiscoidali; discurile albe, negre şi cenuşii reprezintă aloficocianina, ficocianina şi ficoeritrina (K, vedere anterioară; L, vedere posterioară) (după Bryant şi colab., 1979).



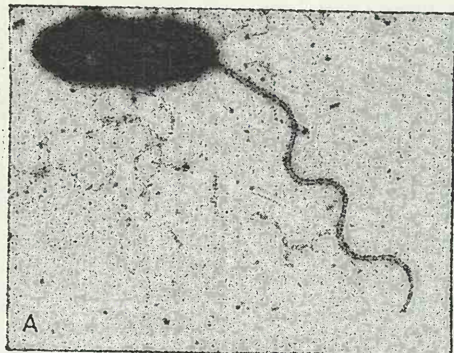


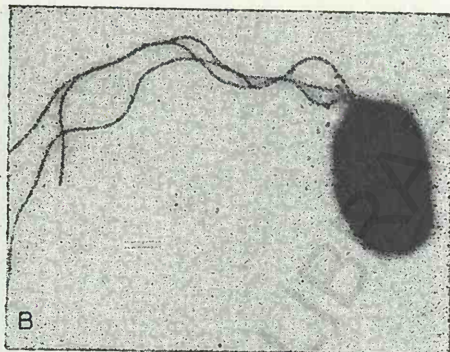
Pl. 6 — A. Fotobacteria *Chlorobium limicola*. Microelectronografia unei secţiuni ultrafine: pc — perete celular purtînd pili(p); la periferia celulei se observă clorosomi (vacuole de clorobium, cv) (după Stanier, 1981).

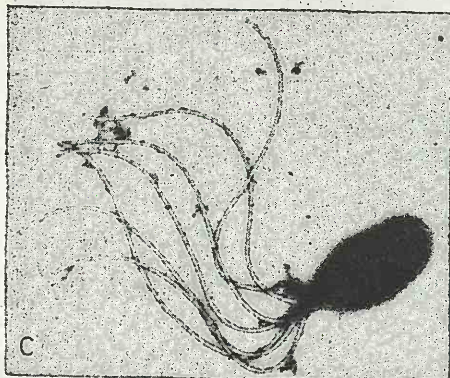
B. *Gloeobacter violaceus*, PCC—7421. Secţiune ultrafină printr-o cianobacterie fără tilacoizi: pc — peretele celular; mc — membrana citoplasmatică; sfc — stratul cortical de ficobiliproteine; p — granulă de polifosfat; c — granulă de cianoficină; cs — carboxisom (după Stanier, Pfennig şi Truper, 1981).

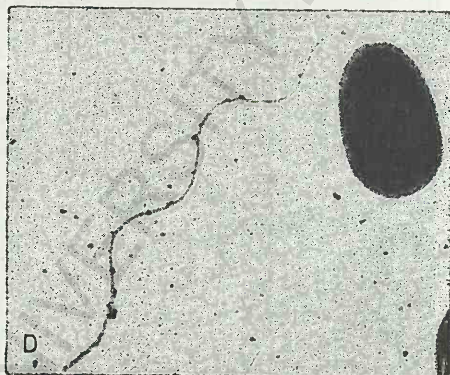


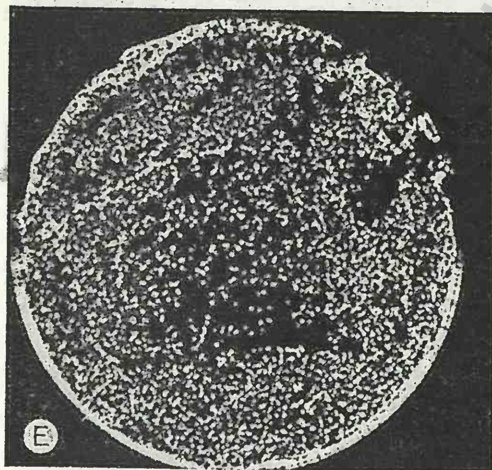
Pl. 7 — Structura ficobilisomilor la cianobacteria LPP—7409. **A.** Secțiune printr-o celulă în curs de diviziune, prezentînd tilacoizi aranjați paralel cu axul mare al celulei la periferia citoplasmei. Ficobilisomii apar ca granule electronopace pe suprafața stromală a tilacoizilor. **B.** Imaginea mărită a unei porțiuni din secțiunea anterioară. Șirurile de ficobilisomi (săgeți) în secțiune longitudinală seamănă cu grămezi de discuri groase de 6—8 nm pe marginea suprafeței tilacoizilor. **C.** Evidențierea șirurilor de ficobilisomi în secțiune transversală. **D.** Imagine mărită a unei secțiuni ultrafine printr-o celulă de *Synechococcus* în curs de diviziune, prezentînd șiruri de ficobilisomi secționați transversal (după Bryant și colab., 1979).

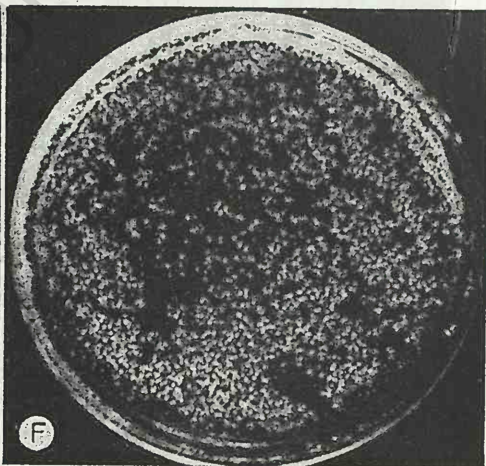




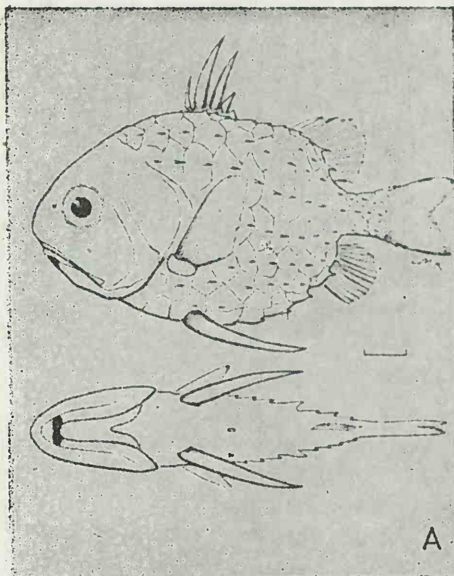


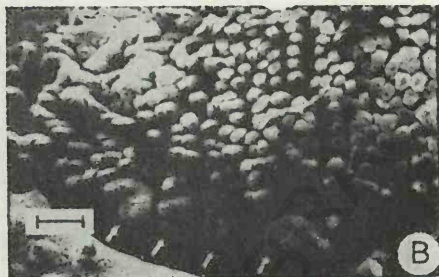






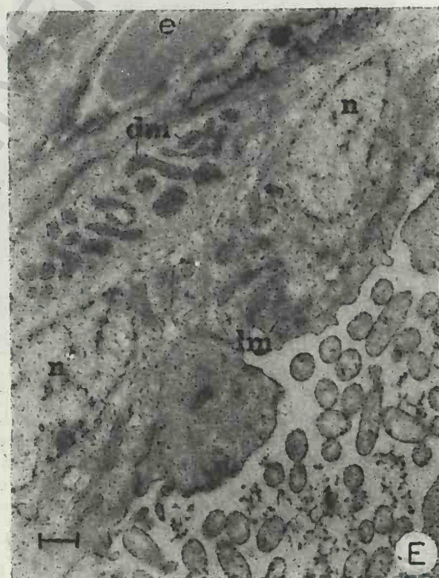
Pl. 8 — Bacterii luminescente (microelectronografia preparatelor colorate negativ). **A.** *Beneckea harveyi*, cu flagel polar prevăzut cu teacă și flageli peritrichi, lipsiți de teacă. **B.** *Photobacterium fischerii* cu un smoc de flageli, avînd teacă. **C.** *P. phosphoreum* cu un smoc de flageli, fără teacă. **D.** *P. leiognathi* cu flagel unic polar, lipsit de teacă (după Baumann, din Hastings și Nealson, 1979). **E.F.** Colonii provenite din culturi de colecție: E, fotografie realizată cu lumina emisă de bacterii. F, aceeași cultură fotografiată la lumina zilei (după Woodland și Hastings, 1976).



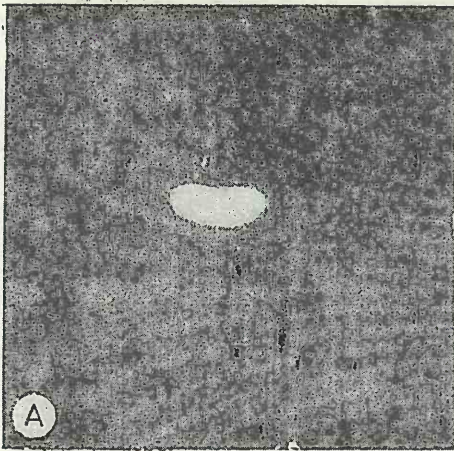


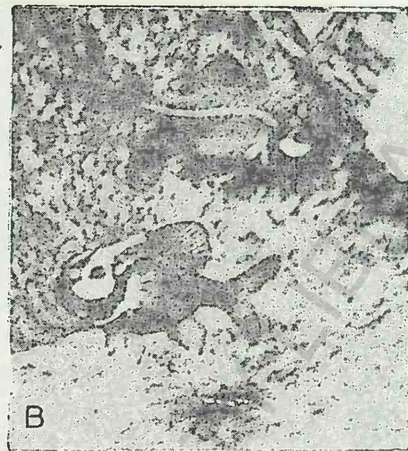


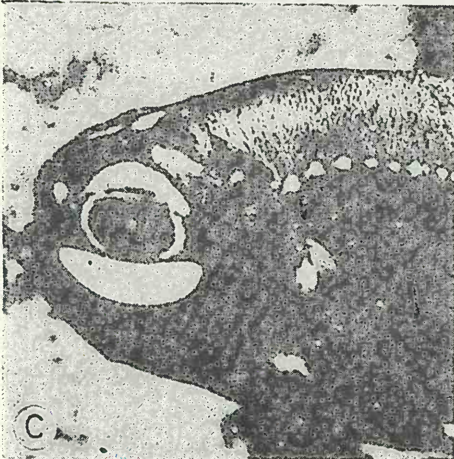


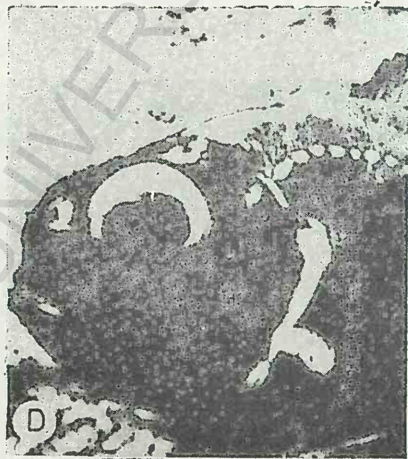


Pl. 9 — Structura organului luminos la peștele *Monocentris japonicus*. **A.** Reprezentare schematică a peștelui, vedere laterală și ventrală, evidențiind localizarea organelor luminoase (suprafețele negre în regiunea ventrală a maxilarului inferior). Bara = 1,0 cm. **B.** Suprafața dorsală a organului luminos, cu numeroase papile dermice. Săgețile indică patru papile prin care are loc emisia de lumină. Bara = 0,2 mm. **C.** Secțiune sagitală prin maxilarul inferior: m — melanocite; t — tubuli cu bacterii; b — os mandibular; d — strat dermic; p — papile dermice. Săgeata indică un canal de emisie a luminii. Bara = 50 µm. **D.** Tubulii organului luminos plini cu bacterii. Bara = 15 µm. **E.** Structura epiteliului tubulilor (microelectronografie): e — eritrocite; t — tubuli cu bacterii luminescente; n — nucleii celulelor epiteliale; lm — mitocondrii cu criste fine și aspect clar; dm — mitocondrii cu criste groase și aspect întunecat. Bara = 1 µm (după Hastings și Nealson, 1979).

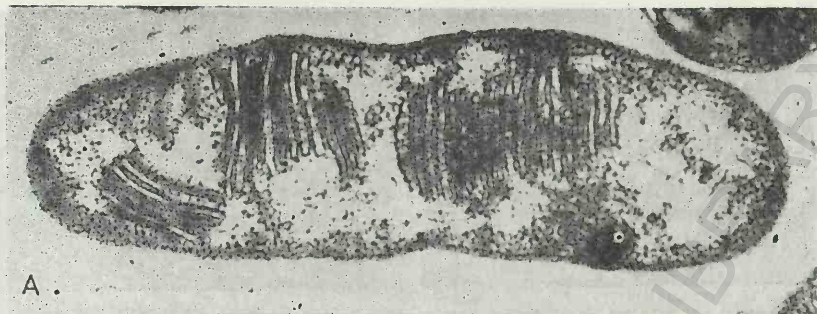


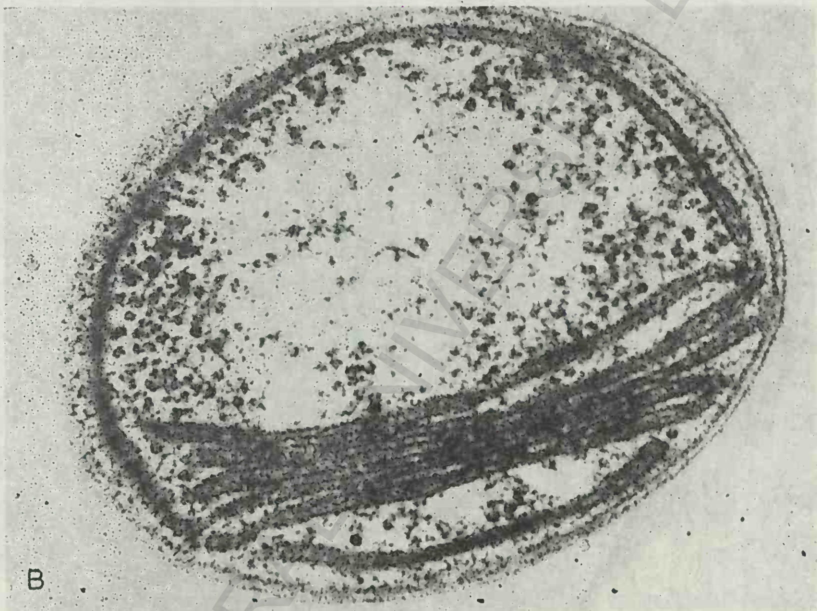




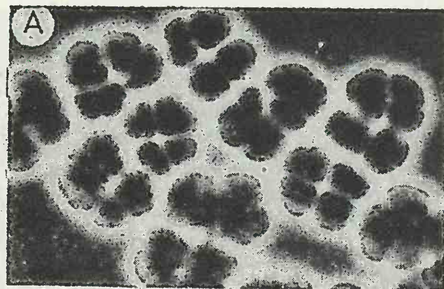


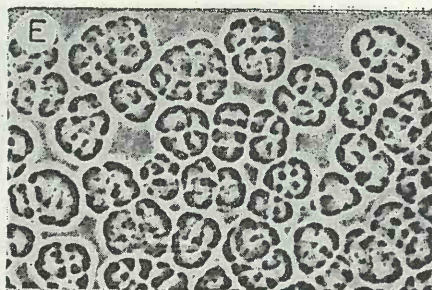
Pl. 10 — *Photoblepharon palpebratus* fotografiat noaptea în mediul său natural, în apa mării, la lumina emisă de propriul său organ luminescent (**A**) şi de un reflector subacvatic (**B, C** şi **D**). Dispozitivul obturator al organului luminos este deschis (C) sau închis (D). Peştele are lungimea de 6,5 cm (după Morin, 1975).

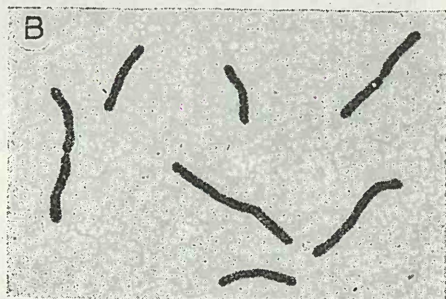


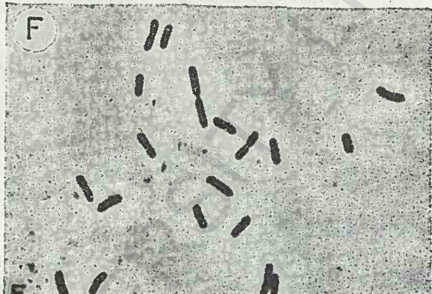


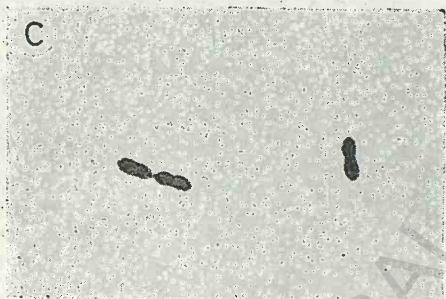
Pl. 11 — Bacterii metilotrofe. Microelectronografii pe secţiuni ultrafine evidenţiind tipul de structuri membranare. A. Bacterie metanotrofă cu membrane de tip I. B. Bacterie metanotrofă cu membrane de tip II (după Whittenbury şi Fitzsimons, 1975).

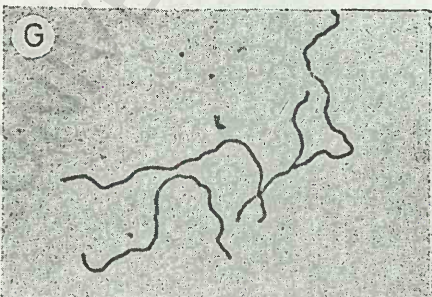




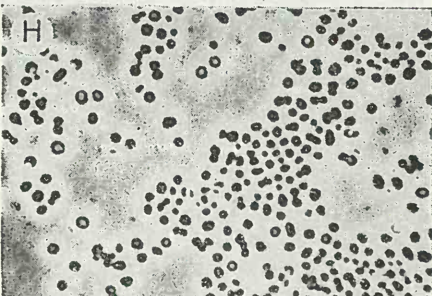




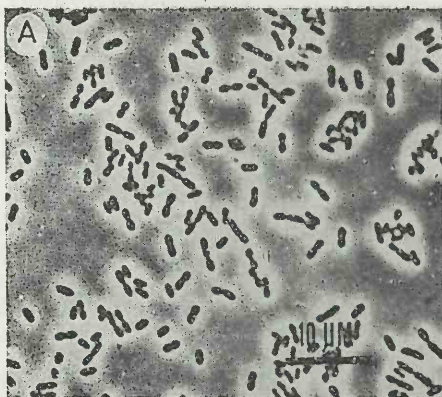


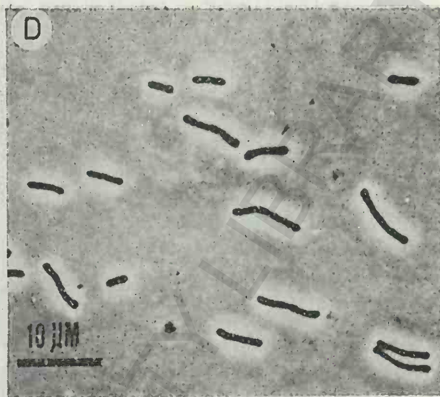


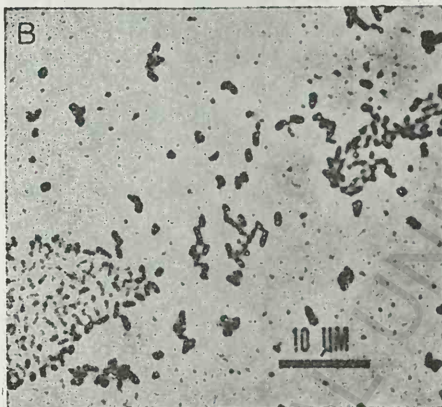


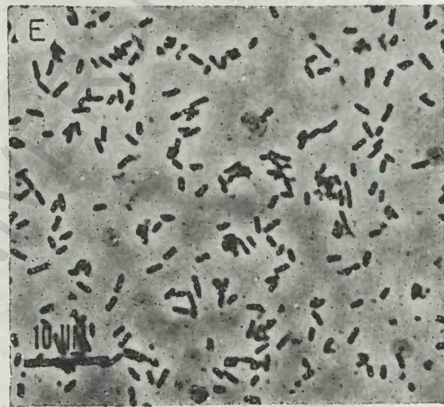


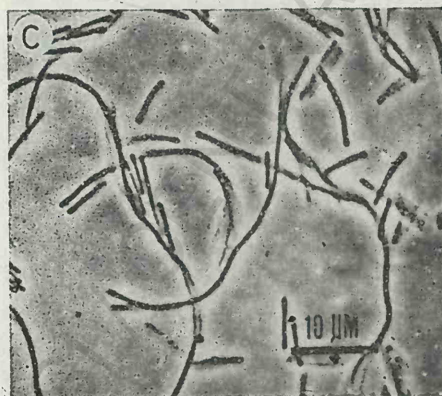
Pl. 12 — Bacterii metanogene. **A.** *Methanosarcina barkeri*. **B.** *Methanobacterium thermoautotrophicum* tulpina AO. **C.** *M. ruminantium*. **D.** *Methanospirillum hungatii*. **E.** *Methanosarcina* tulpina UBS. **F.** *Methanobacterium arbophilicum*. **G.** *M. thermoautotrophicum*, tulpina △H. **H.** *Methanococcus* (după Zeikus, 1977).

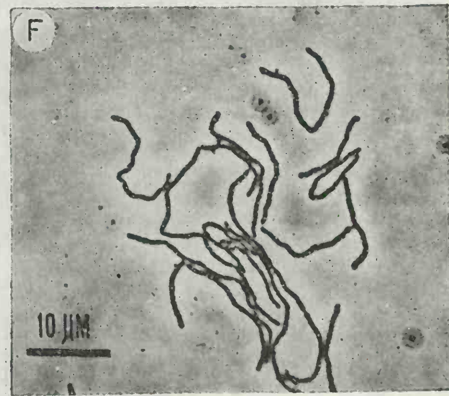




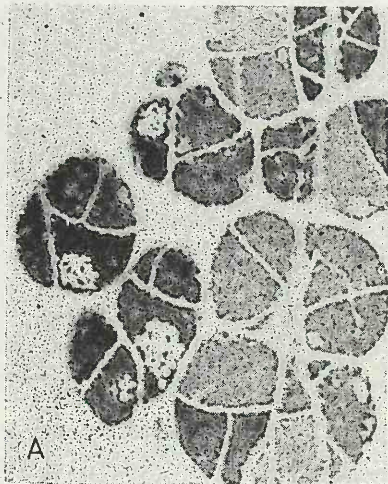


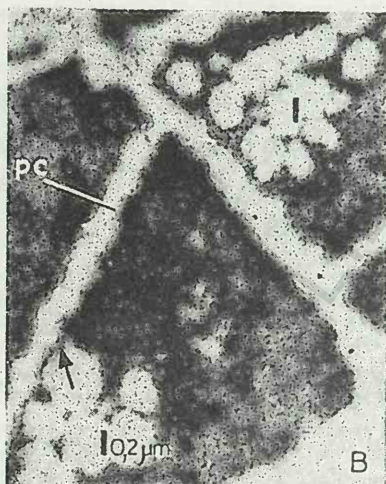


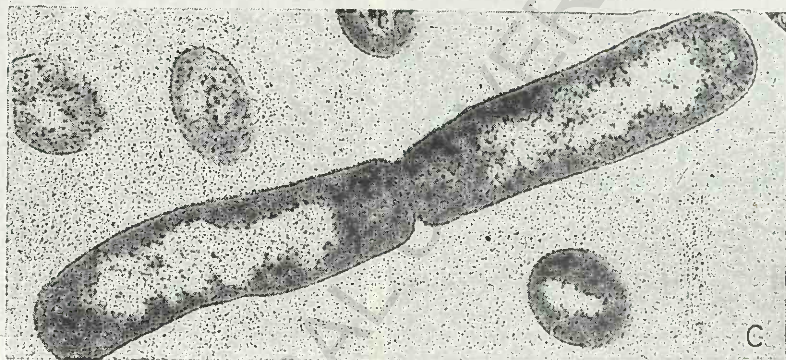


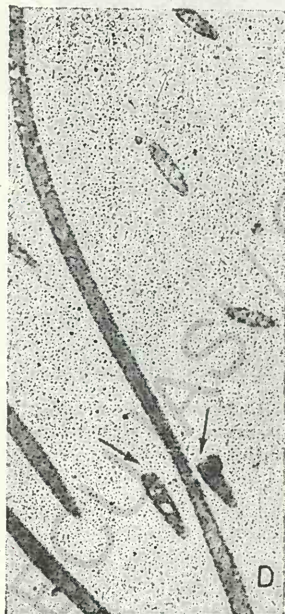


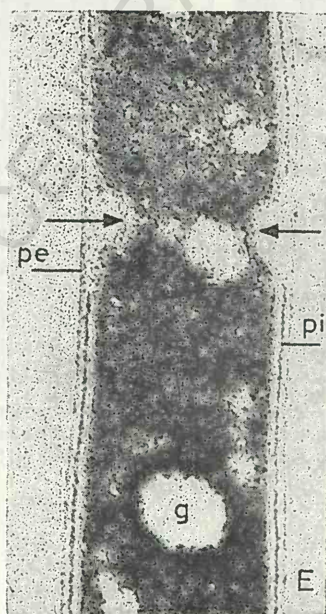
Pl. 13 — Bacterii metanogene. **A.** *Methanobrevibacter ruminantium.* **B.** *Methanomicrobium mobile.* **C.** *Methanobacterium formicicum.* **D.** *M. bryantii.* **E.** *Methanobrevibacter arboriphilus.* **F.** *Methanobacterium thermoautotrophicum* (din Mah și Smith, 1981).

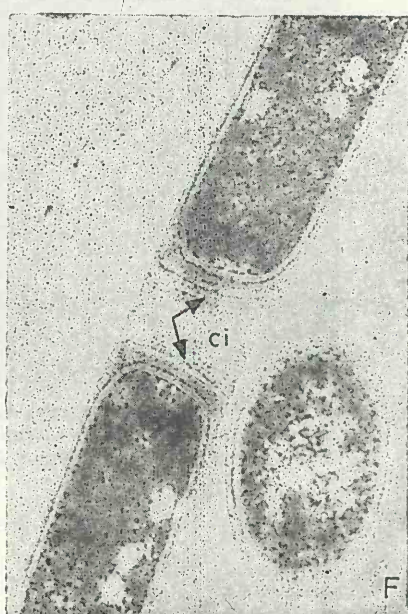

A

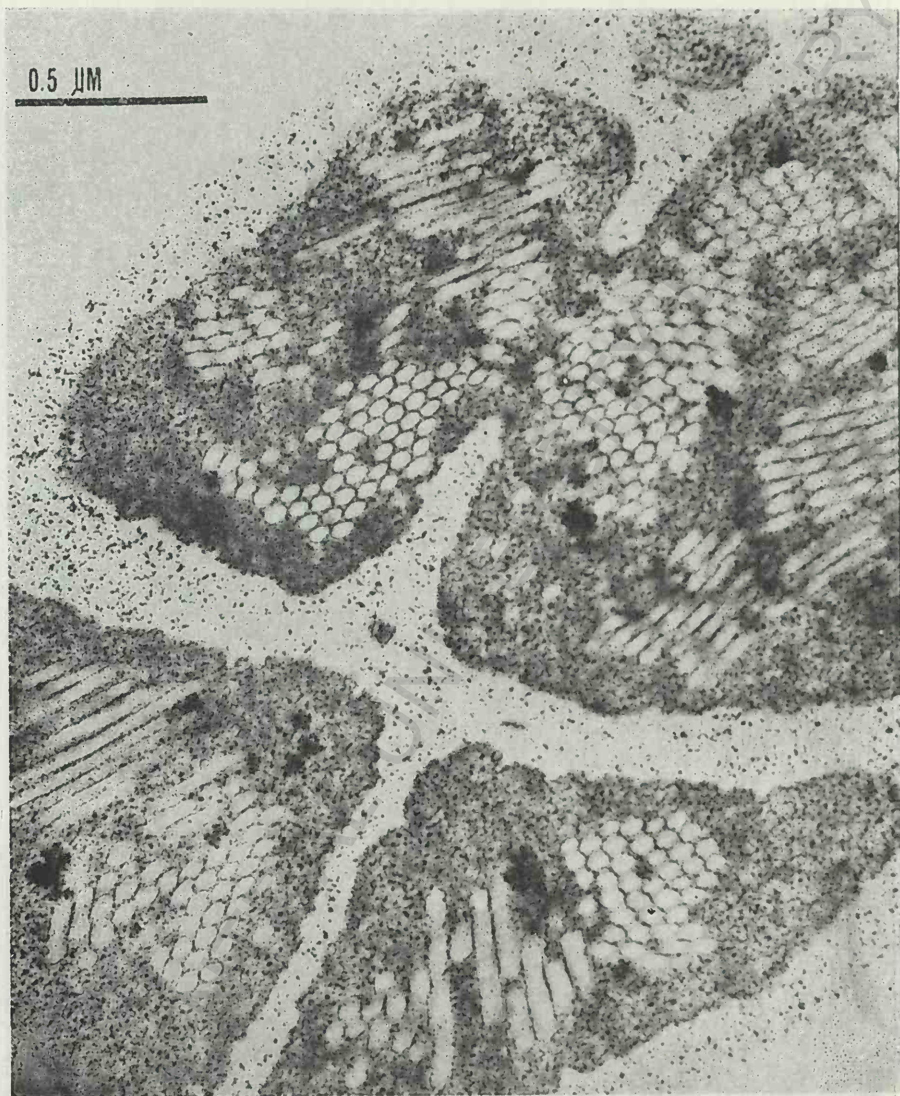

pc
l
0,2 µm
B


C


D


pe
pi
g
E


ci
F



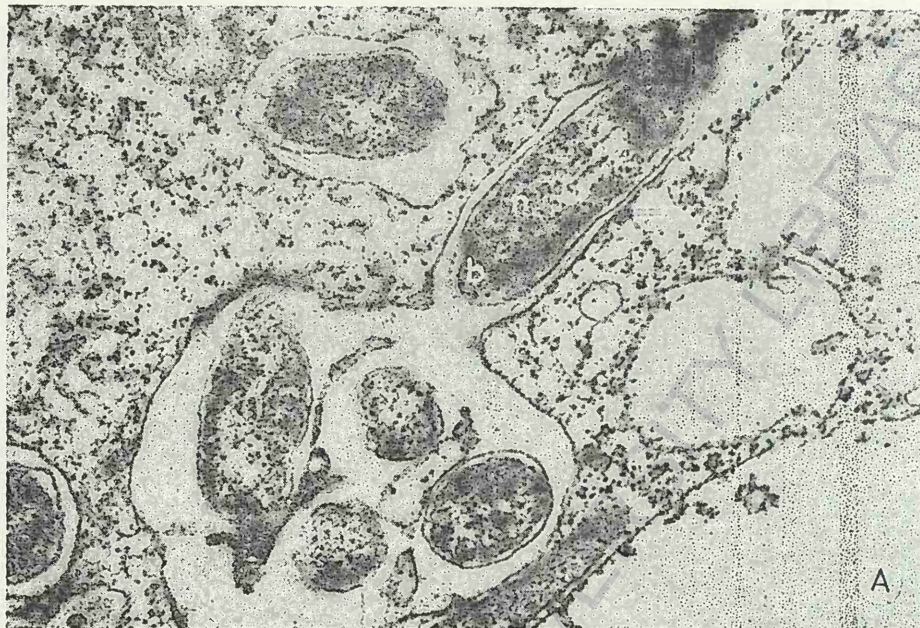
Pl. 14—Bacterii metanogene. *Methanosarcina*, tulpina W. Microelectronografia unei secțiuni ultrafine evidențiind compartimentarea celulară, prezența vacuolelor cu gaze și a unui strat extern, neobișnuit, de înveliș (după Pangborn, 1981).

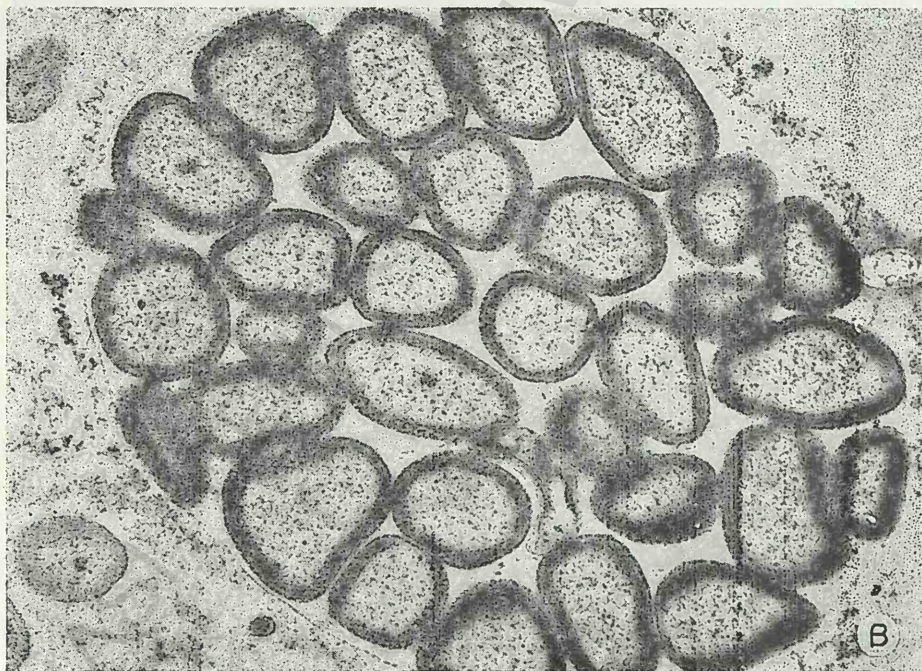
Pl. 15 — Bacterii metanogene. **A.** Agregate de *M. barkeri*. **B.** *M. barkeri*. Secțiune ultrafină evidențiind peretele celular (pc), atașat de membrana citoplasmatică (→), și incluziunile care pot conține materiale de rezervă. Bara = 0,20 μm. **C.** *Methanobacterium*, tulpina MOH, aspect general al ultrastructurii. Microelectronografii (după Zeikus, 1977). **D.** *Methanospirillum*. Secțiune razantă evidențiind o celulă spiralată și filamente rupte (↙). **E.** Secțiune ultrafină evidențiind procesul de diviziune celulară realizat prin invaginarea peretelui intern (pi) și a membranelor citoplasmatice (←); peretele extern (pe) își păstrează continuitatea; incluziuni granulare (g). **F.** Celulele de *Methanospirillum* dintr-un filament sînt separate printr-un compartiment intercelular (ci); săgețile indică elementele structurale ale acesteia (după Zeikus, 1977).



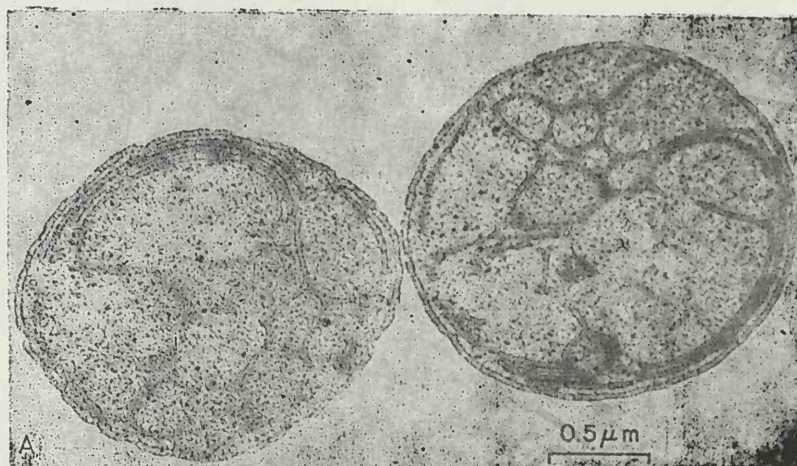
Pl. 16 — Bacterii fixatoare de N_2 simbiotice. Secţiune transversală printr-o nodozitate de la trifoi, evidenţiind cîteva celule adiacente infectate cu *Rhizobium*. Celula din dreapta conţine bacteroizi (b), iar celelalte, bacterii nediferenţiate (r), acoperite uneori de membrane celulare (mc): m — mitocondrii; g — granule (probabil amidon); n — nucleul celulei vegetale; pc — peretele celulei vegetale (după Beringer şi colab., 1979).

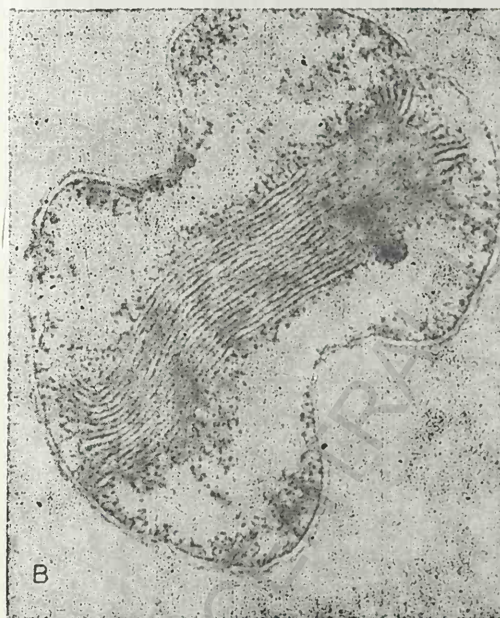
Pl. 17 — *Rhizobium meliloti*. Secțiune printr-o nodozitate de la lucernă (*Medicago sativa*), evidențiind bacteroizi înconjurați de membrane cu pereți dubli (m); pc — peretele bacteroidului apare ca un strat întunecat. Materialul nuclear al bacteroidului este mai dispersat și constă din filamente fine osmiofile, într-o matrice transparentă pentru electroni (după Jordan și colab., 1963). Bara = 1,0 μm.

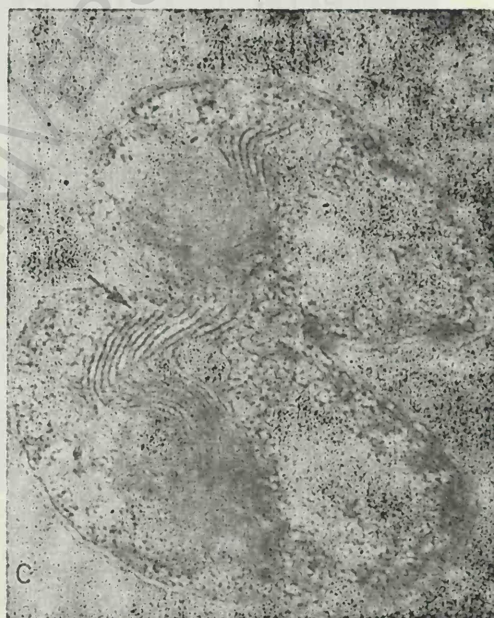




Pl. 18 — **A.** *Rhizobium japonicum.* Secţiune printr-o nodozitate de soia, evidenţiind o bacterie (b) deplasîndu-se în citoplasmă prin endocitoză (după Goodchild şi Bergersen, 1966). n—regiunea nucleară a bacteriei.
B. *Nitrosomonas europaea.* Agregat lax de celule inclavate şi înconjurate de un strat lax de mucus electrontransparent (zooglee) (după S.W. Watson şi colab., 1981).

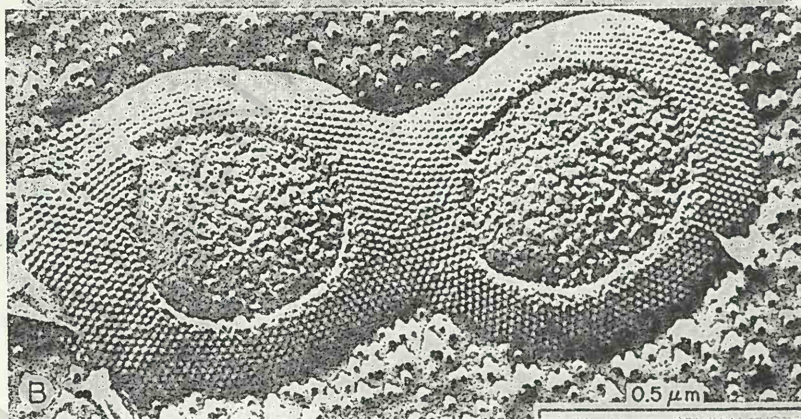




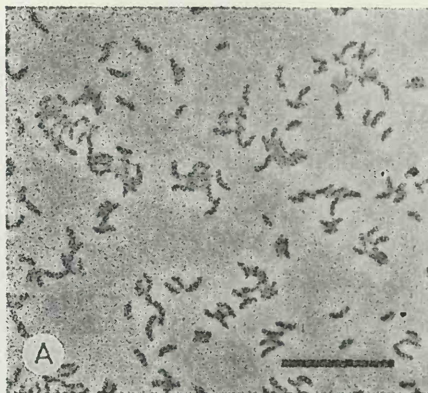


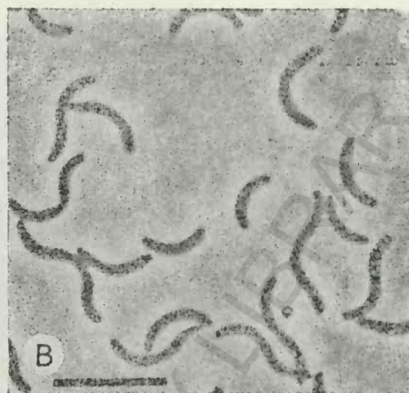
Pl. 19 — **A.** *Nitrosococcus mobilis.* Microelectronografia unor secţiuni ultrafine, evidenţiind aranjarea citomembranelor (după Koops, Harms şi Wehrmann, 1976).
B.C. *Nitrosocystis oceanus* — stadiile finale ale diviziunii prin strangulare. Procesul de diviziune pare să secţioneze membranele intracelulare. Modificările în orientarea lamelelor determină atenuarea detaliilor de structură (după Murray şi S.W. Watson, 1965).

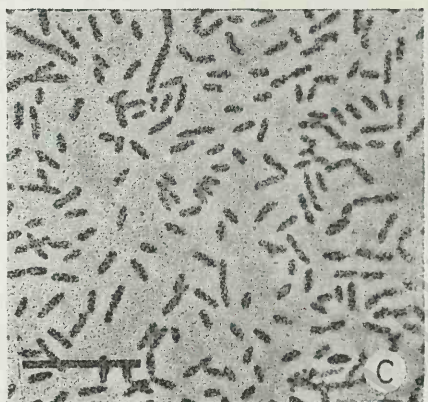


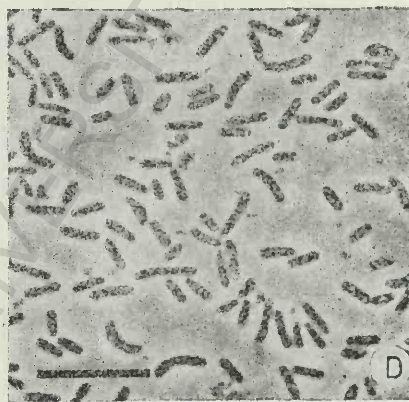


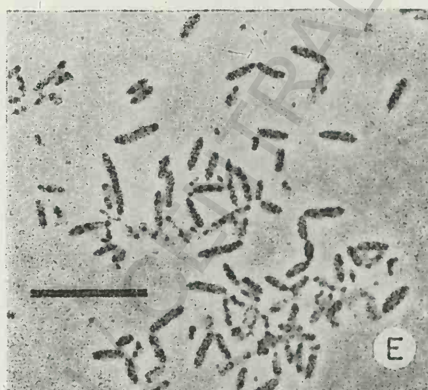
Pl. 20 — **A.** Bacterii nitrificatoare. Secţiune ultrafină prin *Nitrosolobus multiformis*, evidenţiind compartimentele celulare central şi periferic (după S.W. Watson şi colab., 1971). **B.** *Nitrosomonas europaea*, tulpină marină. Microelectronografie după tehnica îngheţare — fracturare, evidenţiind structura stratului extern al peretelui celular şi aranjamentul simetric macromolecular al subunităţilor de construcţie (după S.W. Watson şi Remsen, 1969).

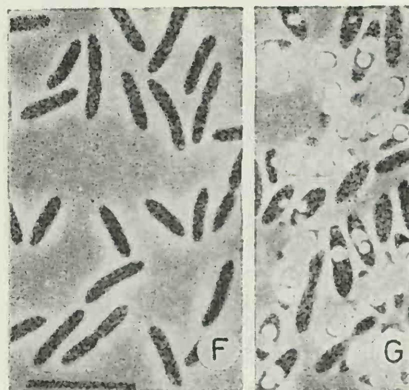




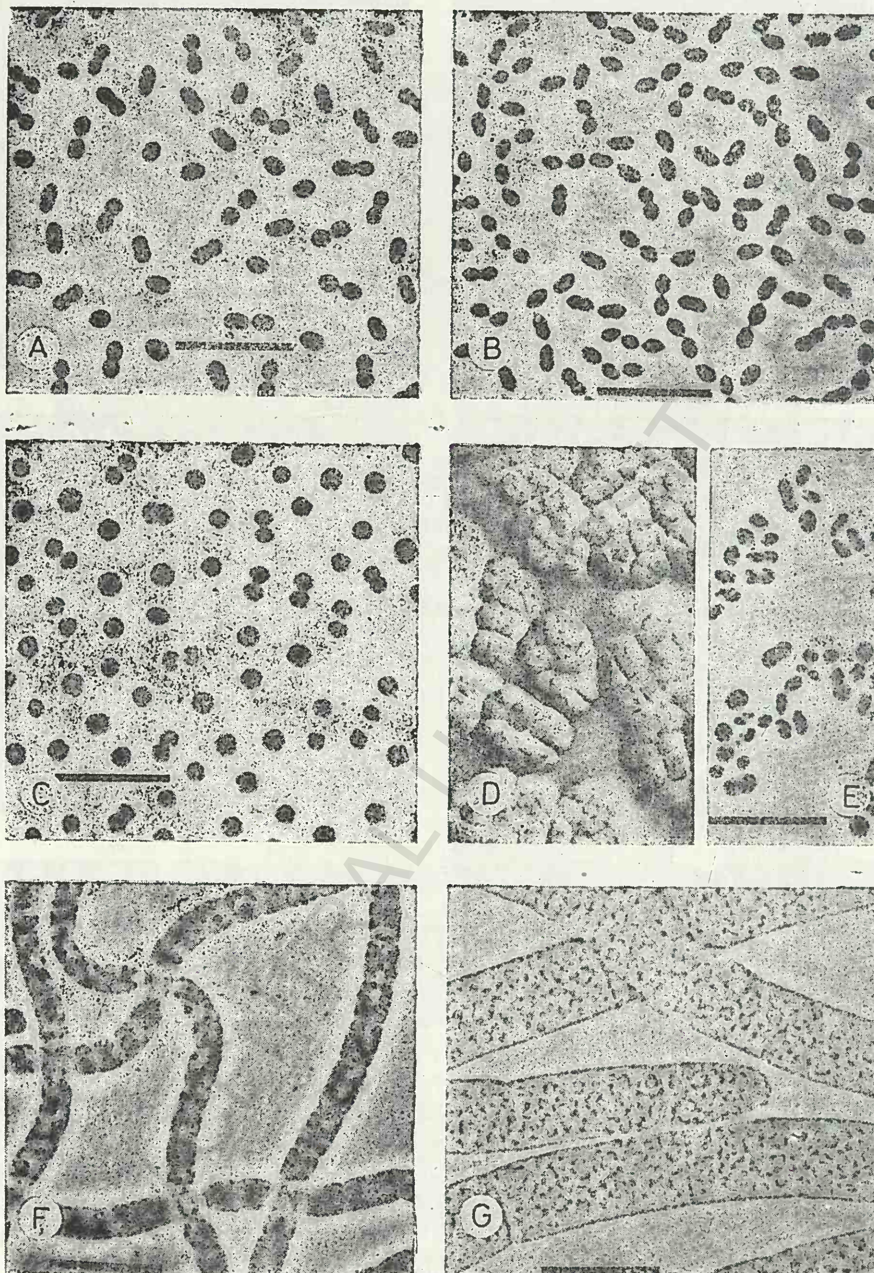




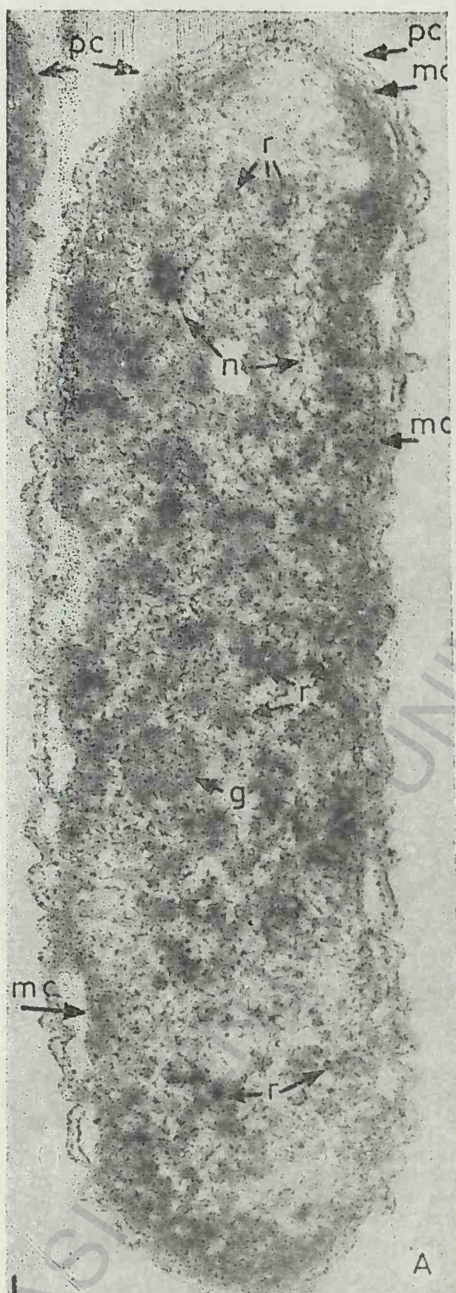




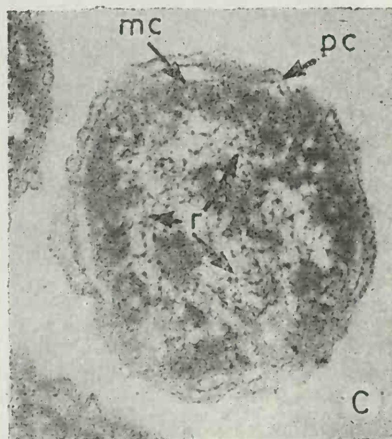
Pl. 21 — Bacterii care folosesc compușii sulfului. **A.** *Desulfovibrio desulfuricans.* **B.** *D. gigas.* **C.** *B. baculatus.* **D.** *Desulfomonas pigra.* **E.** *Desulfotomaculum nigrificans.* **F.G.** *D. acetooxidans.* În stînga sînt celule vegetative, în dreapta, celule cu spori sferici și vacuole cu gaze. Barele = 10 μm (fotografii în contrast de fază, după Pfennig, Widdel și Trüper, 1981).



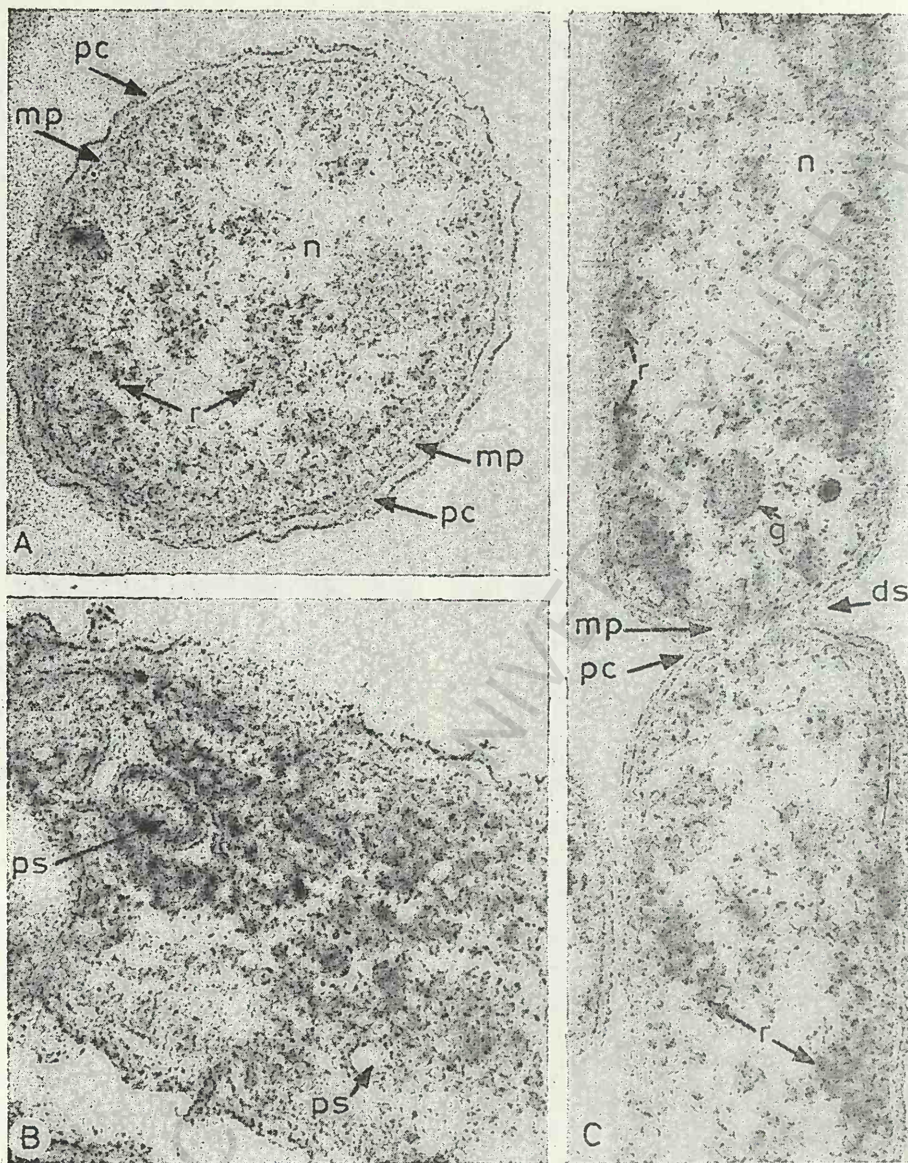
Pl. 22 — Bacterii care utilizează compușii sulfului. **A.** *Desulfobacter postgatei*. **B.** *Desulfobulbus propionicus*. **C.** *Desulfococcus multivorans*. **D. E.** *Desulfosarcina variabilis* (în stînga, pachete de bacterii evidențiate prin interferență de contrast, în dreapta, celule vii). **F.** *Desulfonema limicola*. **G.** *D. magnum*. Microfotografii în contrast de fază (A—D) și în cîmp clar (F, G). Barele = 10 μm (după Pfennig, Widdel și Trüper, 1981).





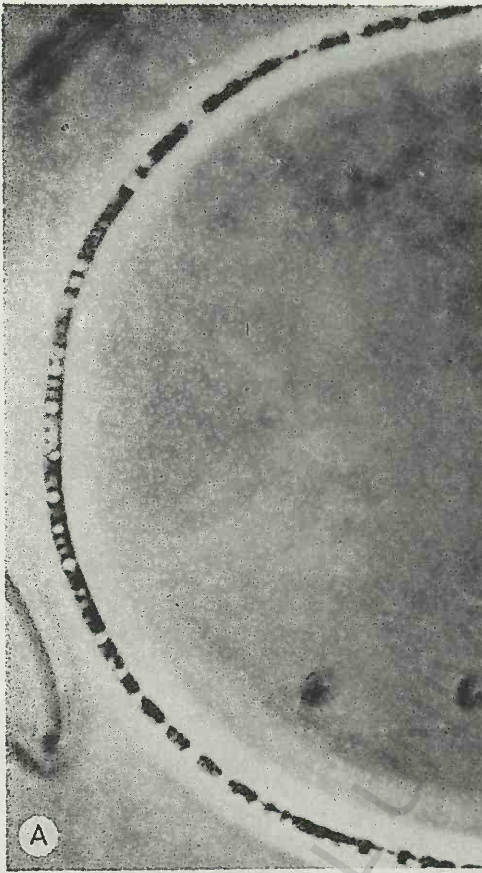


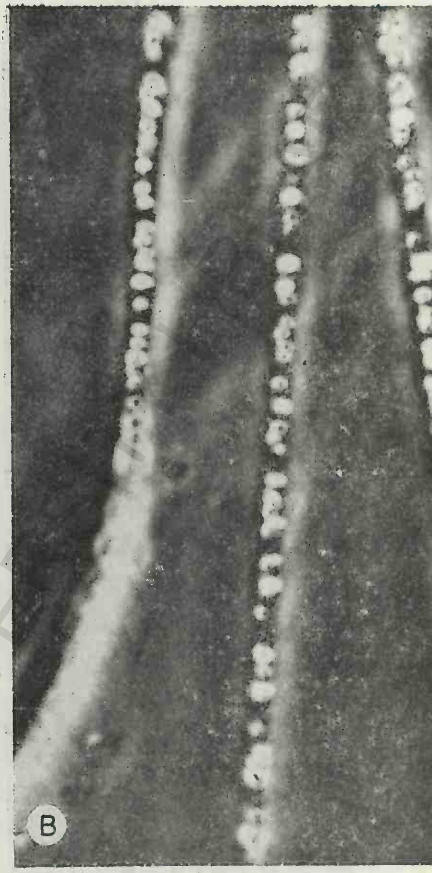
Pl. 23 — *Thiobacillus thiooxidans.* Microelectronografiile unor secțiuni longitudinale (A), oblice (B) și transversale (C), evidențiind peretele celular (pc), membrana plasmatică (mc), nucleoplasma (n), ribosomii (r) și granule de origine necunoscută (g) (după Mahoney și Edwards, 1966).

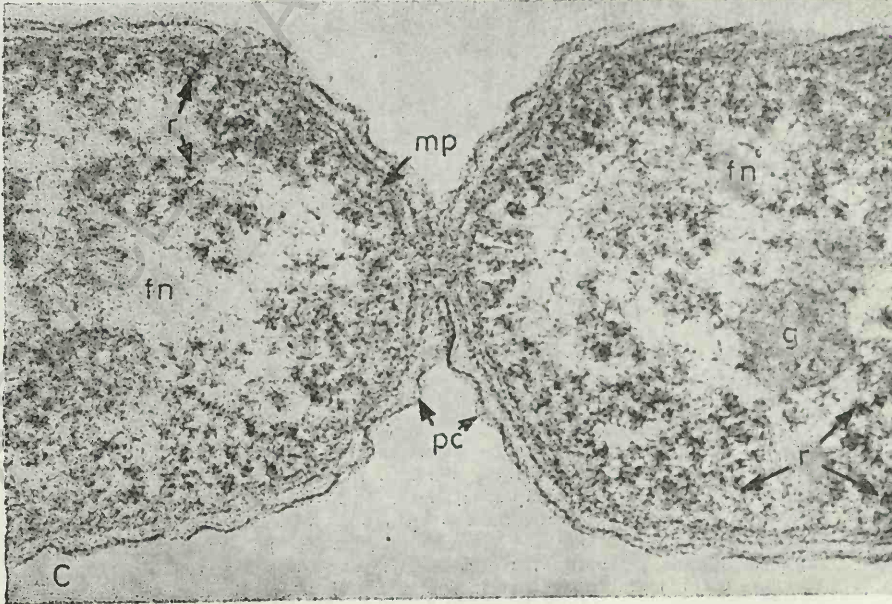


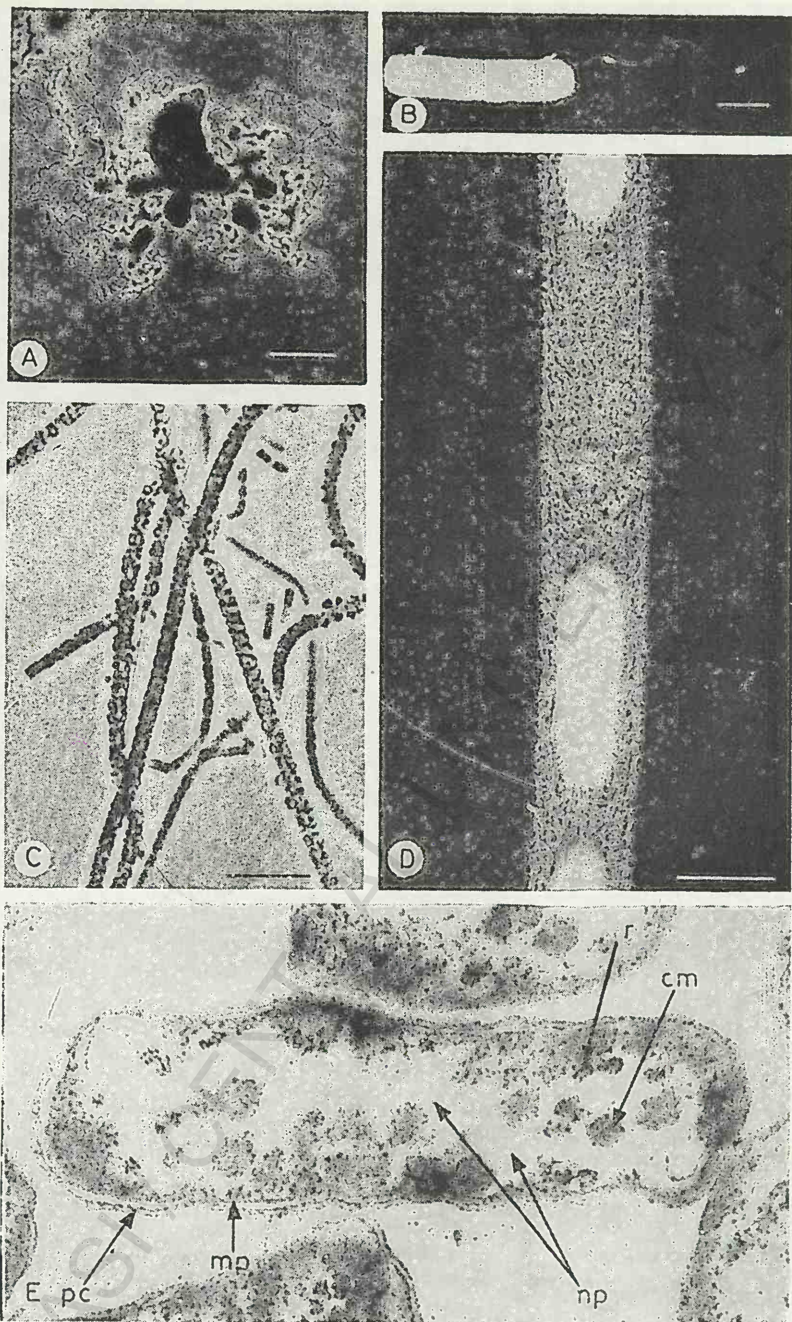
Pl. 24 — *Thiobacillus thiooxidans.* Secţiune transversală evidenţiind nucleoplasma (n) şi ribosomii (r) dispersaţi în toată celula. Structurile similare mezosomilor sau plasmalemasomilor (ps) apar ca invaginări ale membranei plasmatice (mp). Secţiune longitudinală mediană printr-o celulă în curs de diviziune prin strangulare (ds); g — granule; pc — peretele celular (după Mahoney şi Edwards, 1966).

Pl. 25 — **A.** Aspectul unui trihom de *Beggiatoa* anterior expunerii la H_2S. **B.** După 12 ore de expunere la H_2S (după Burton şi Morita, 1964). **C.** *Thiobacillus thiooxidans.* Microelectronografia unei celule în faza finală a diviziunii. Secţiune longitudinală în regiunea mediană. Membrana citoplasmatică (mp) formează un strat continuu în zona de separare , în timp ce peretele celular (pc) este încă incomplet. Imaginea evidenţiază zona filamentelor nucleoplasmei (fn), ribosomii (r) şi granulele de origine necunoscută (g) (după Mahoney şi Edwards, 1966).

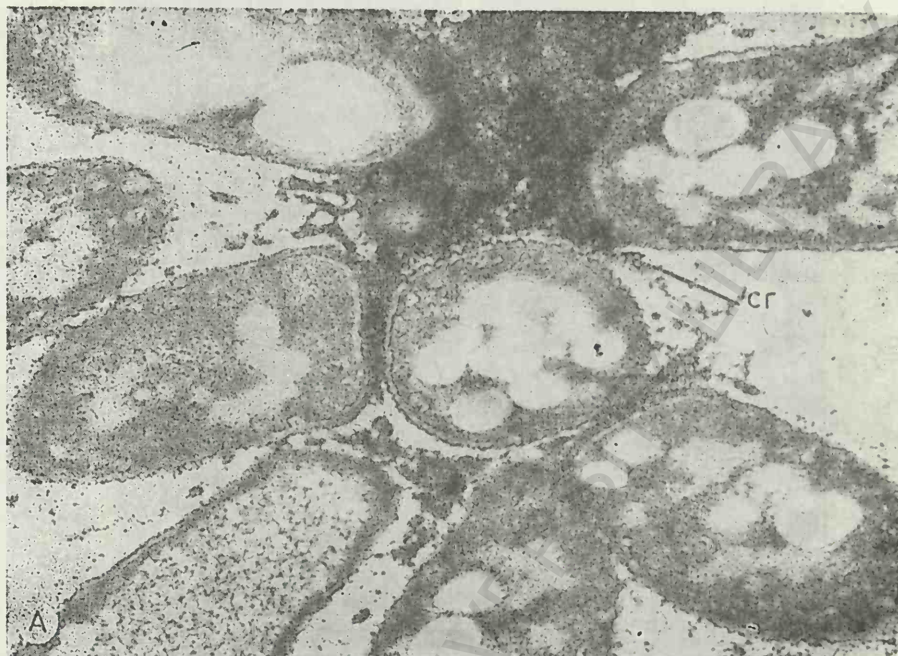

A

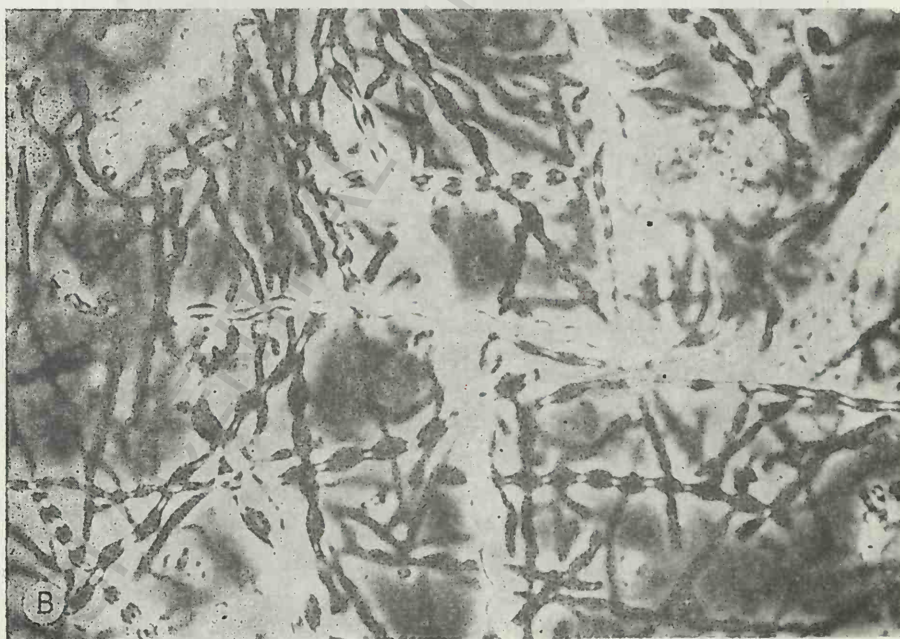

B


r
mp
fn
fn
g
pc
r
C



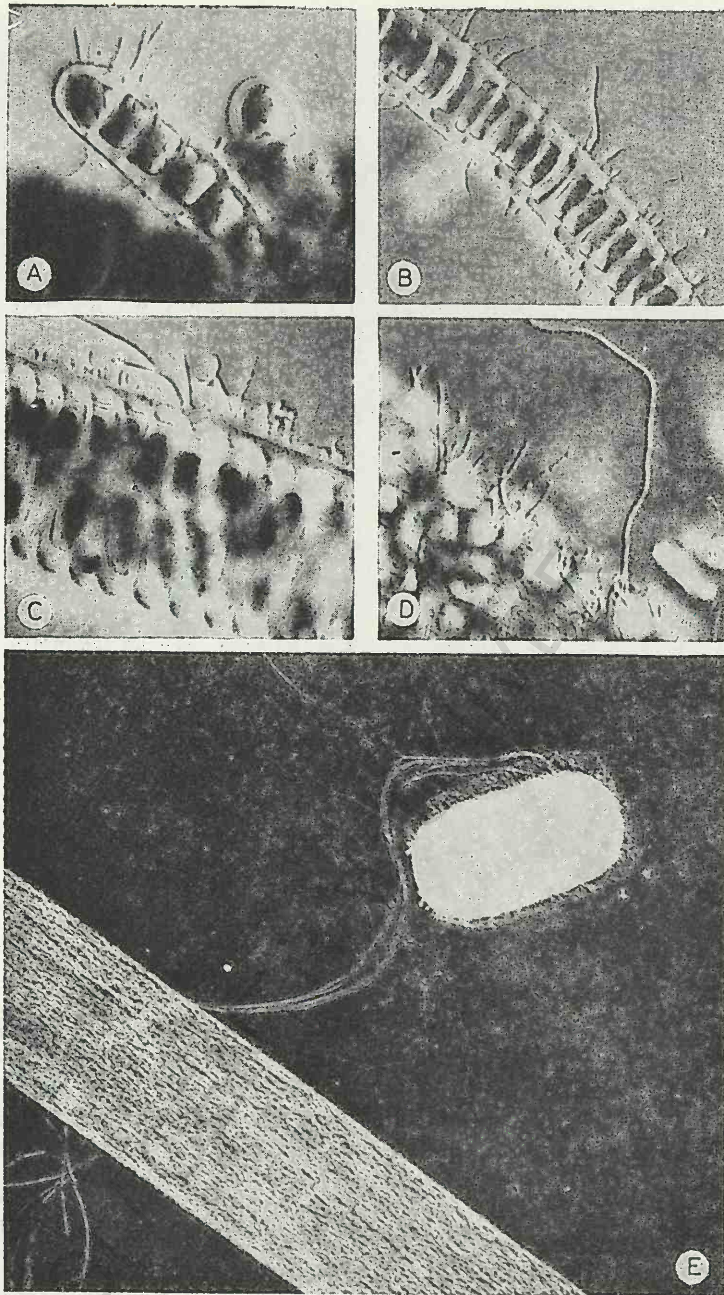
Pl. 26 — Bacteriile feruginoase *Leptothrix cholodnii*. **A.** Colonie de filamente cultivate pe agar cu $MnCO_3$. Bara = 100 μm. **B.** Celulă izolată cu un flagel polar. Bara = 1,0 μm. **C.** Teci încrustate cu MnO_2. Bara = 10 μm. **D.** Structura regiunii de suprafață a tecii. Bara = 1 μm (după Van Veen și Mulder, 1981). **E.** *Ferrobacillus ferrooxidans*. Microelectronografie: pc — perete celular; mp — membrana plasmatică; r — ribosomi; np — regiunea nucleoplasmei; cm — corpi membranoşi denşi, corespunzînd probabil mezosomilor (după Dugan şi Lundgren, 1965).





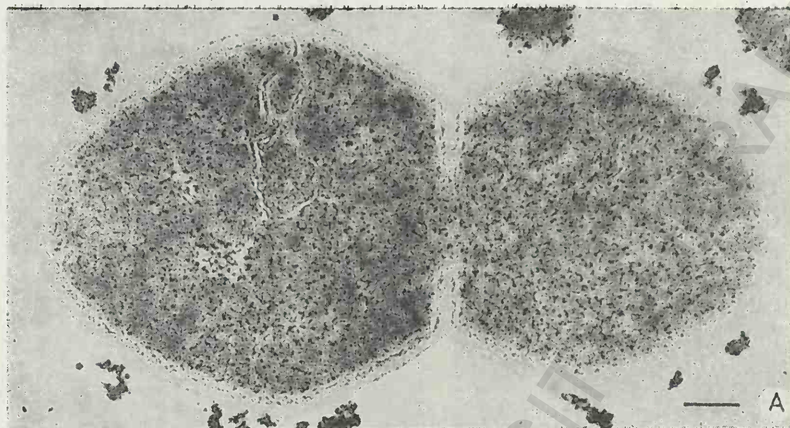
Pl. 27 — **A.** *Leucothrix mucor.* Secţiune ultrafină printr-o rozetă, evidenţiind substanţa constitutivă a crampoanelor (cr) sub forma unui strat electronopac înconjurînd celulele (după Brock şi Conti, 1969).

B. *Gallionella ferruginea*, cultură pură obţinută dintr-o conductă de drenaj (după Hanert, 1981).

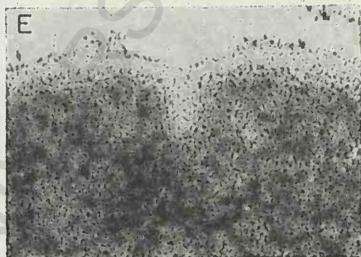


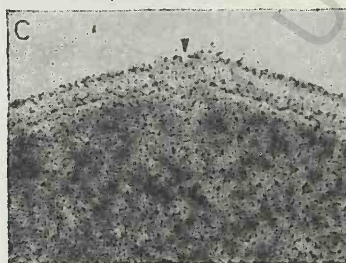
Pl. 28 — Filamente de *Leucothrix mucor* legate de alga marină *Bangia fuscopurpurea*. **A.** Forme foarte tinere. **B.** Forme tinere. **C.** Forme mature. **D.** Forme bătrîne. Microfotografie prin interferență de contrast (după Bland și colab., 1973).

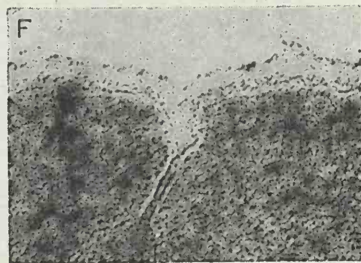
E. *Sphaerotilus natans*. Celulă izolată cu un smoc de flageli subpolar și teaca cu suprafața netedă (după Mulder și Deinema, 1981).



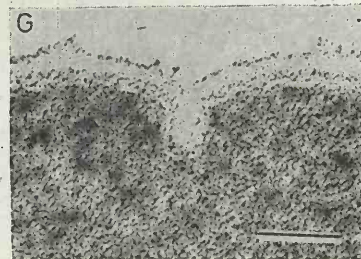




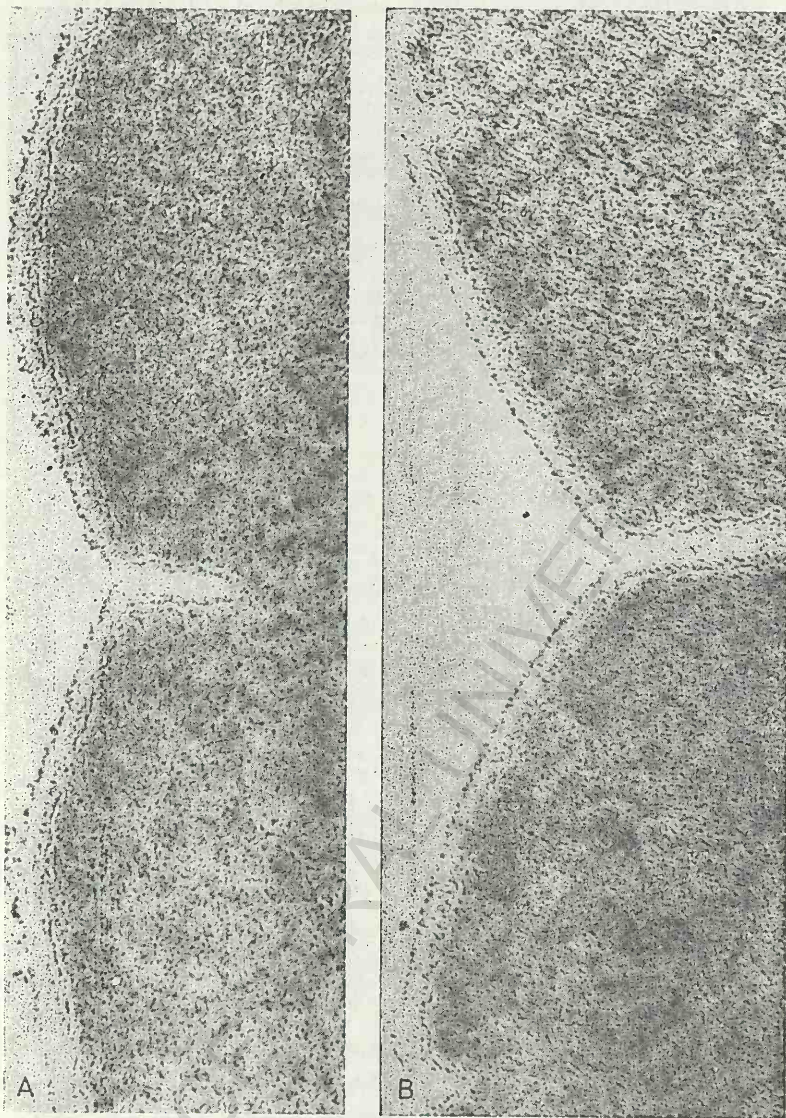








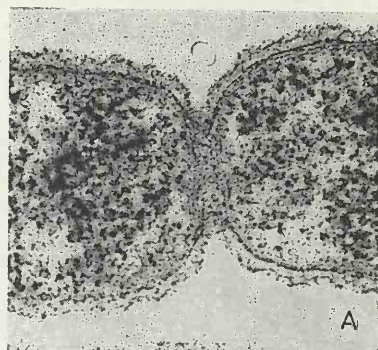
Pl. 29 — Creşterea peretelui celular la *Streptococcus faecalis*. **A.** Secţiune longitudinală printr-o celulă aflată în faza exponenţială de creştere în curs de diviziune prin sept transversal. Imaginea evidenţiază, în special la celula din stînga, începutul formării benzii ecuatoriale, ca o proeminenţă pe suprafaţa externă a peretelui celular. Bara = 0,1 µm. **B—G.** Secţiuni transversale în regiunea ecuatorială , evidenţiind creşterea peretelui celular periferic şi a septului transversal. În fig. B, săgeata indică o singură bandă a peretelui celular, iar în fig. C, indică şanţul care marchează iniţierea formării septului transvers şi începutul creşterii peretelui celular. Bara = 0,1 µm (după Higgins şi Shockman, 1970).

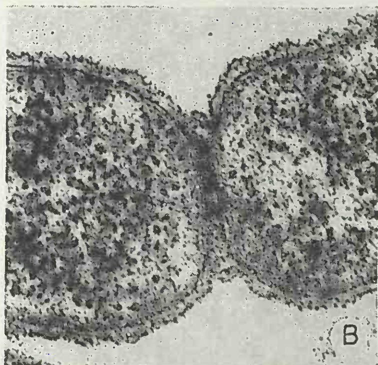


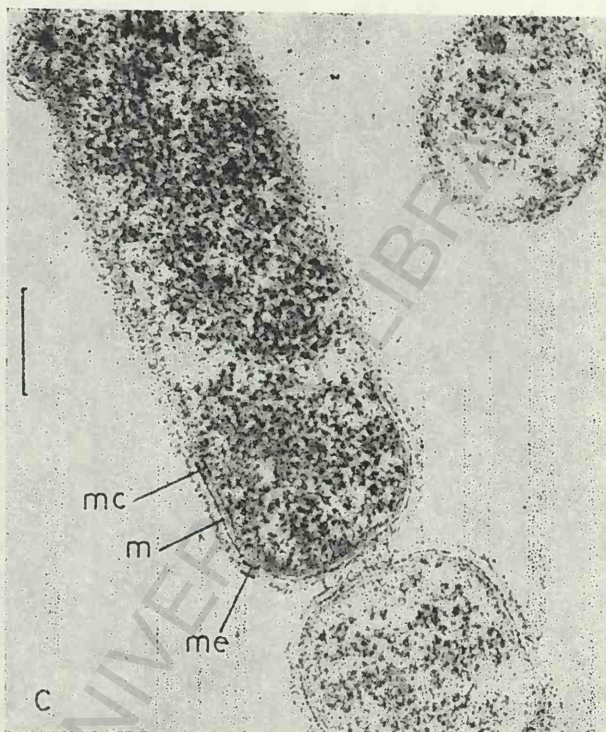
Pl. 30 — A.B. Creşterea peretelui celular la *S. faecalis*. Secţiuni longitudinale în cursul fazelor iniţiale ale diviziunii, evidenţiind pătrunderea în citoplasmă a septului transversal (A) şi creşterea lui (B) (după Higgins şi Shockman, 1970).

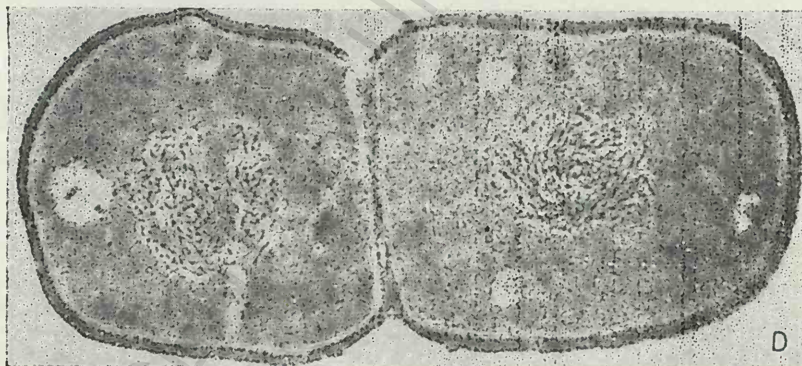
Pl. 31 — A, B, C. Multiplicare prin septare la caulobacterii. Microelectronografia unor secţiuni ultrafine a celulelor de *Asticcacaulis excentricus*, evidenţiind stadiile succesive (A – C) ale procesului de septare. Imaginea evidenţiază stratul mai puţin dens faţă de electroni, probabil de natură polizaharidică, acoperind membrana externă a peretelui celular: m — stratul de mureină; me — membrana externă; mc — membrana citoplasmatică. Bara = 200 nm (după Poindexter şi Hagenzieker, 1981).

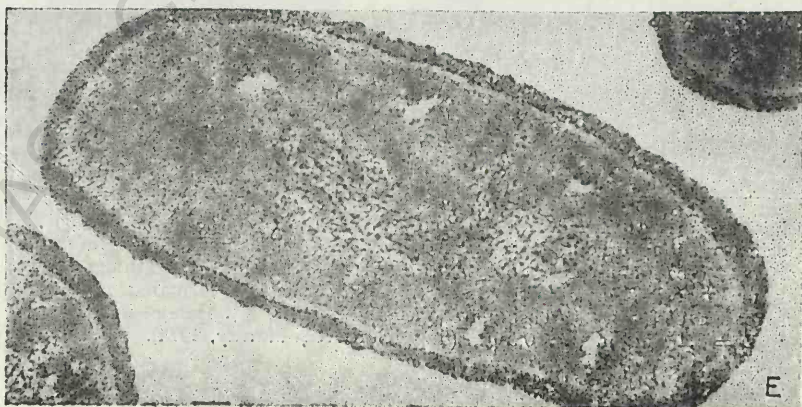
D. Diviziunea celulară şi nucleară la *B. subtilis*. Celule în faza staţionară cu nucleoizi sferici, condensaţi şi mezosomi mici. E. Celule cu nucleu în curs de diviziune. Unii mezosomi mici, de la periferia celulei, rămîn în contact cu nucleoplasma (după Van Iterson şi colab., 1975).

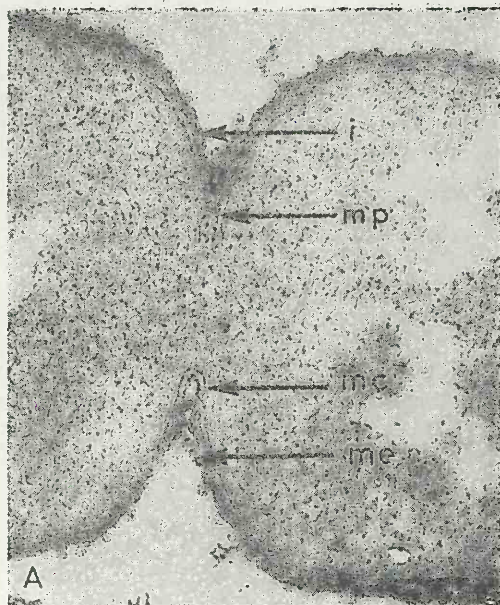

A

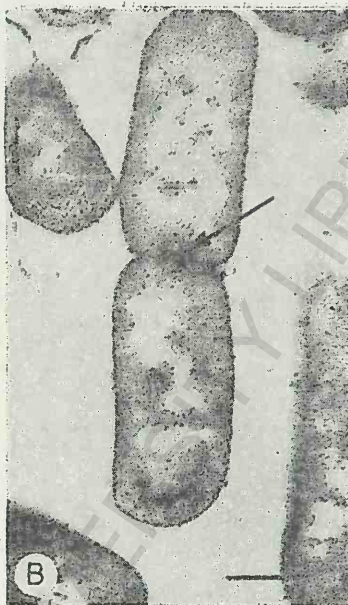

B

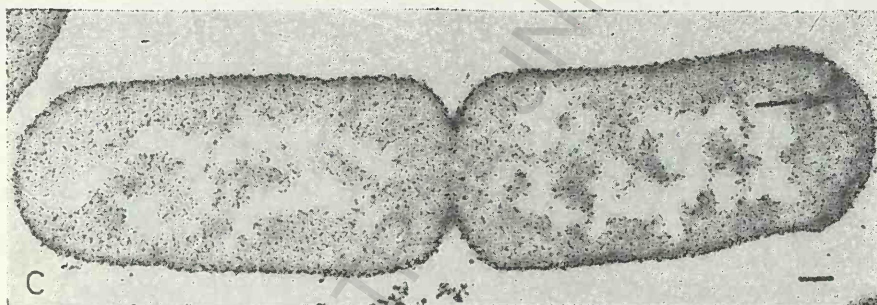

mc
m
me
C

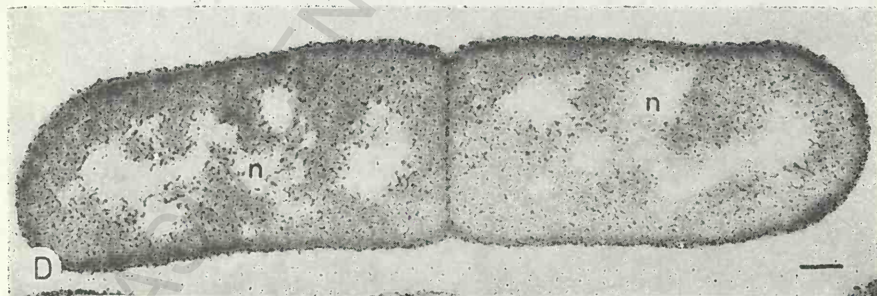

D


E

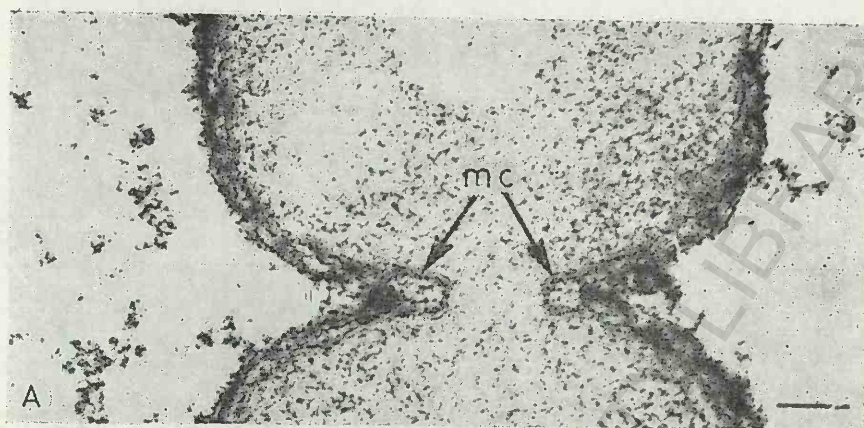


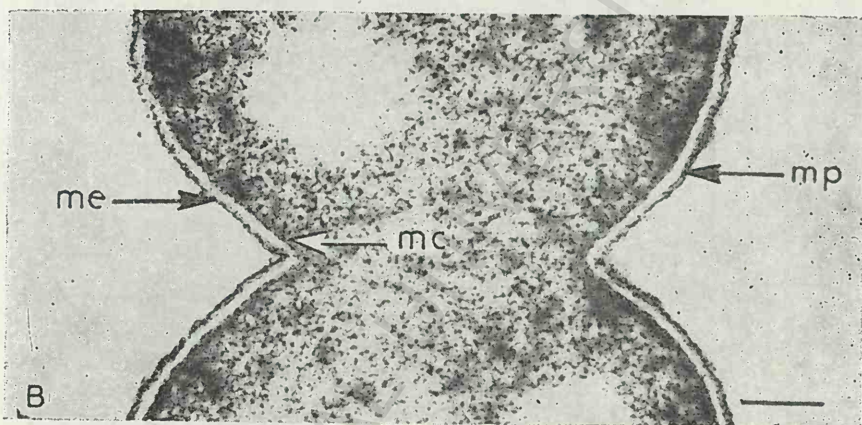


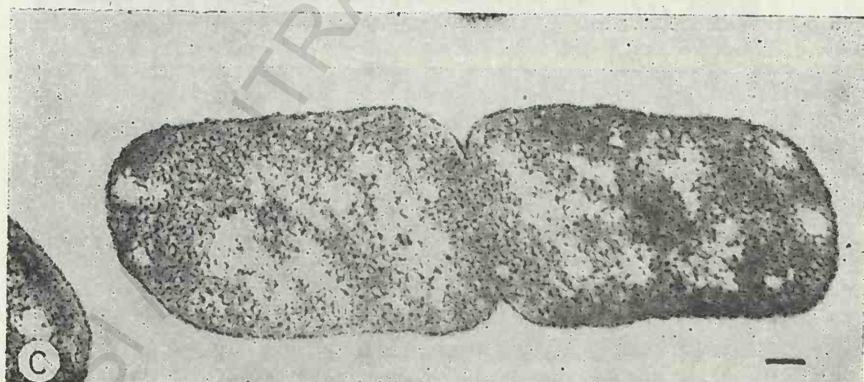




Pl. 32 — Diviziune prin septare la *E. coli* B/r (**A**, **C**, **D**) și la *E. coli* B (**B**). A. Septul este format printr-o invaginare a membranei citoplasmatice (mc) și a mucopeptidului (mp) sau numai prin creșterea membranei citoplasmatice (D); n—nucleoid. Stratul intermediar (i) situat între mucopeptid și membrana externă (me) nu participă la formarea septului. Săgețile nemarcate indică structuri similare mezosomilor (B, C). Barele în A, C și D = 0,1 μm; în B = 0,5 μm (după Burdett și Murray, 1974).





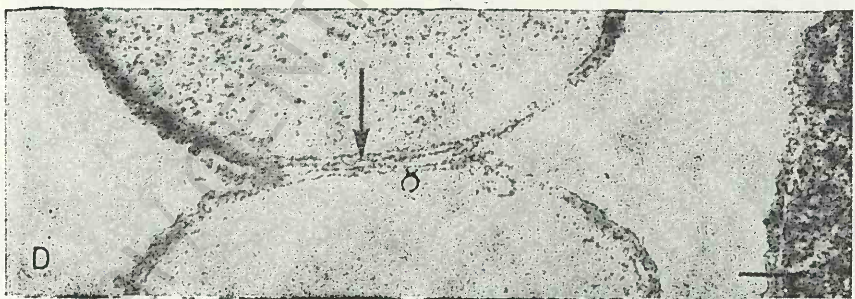


Pl. 33 — Diviziune prin constricție la *E. coli* B/r (A), *E. coli* CRT-257 (B) și *E. coli* B(C), evidențiind invaginarea profundă a membranei citoplasmatice (mc), membranei externe (me) și mucopeptidului (mp) (după Burdett și Murray, 1974). Barele = 0,1 μm.

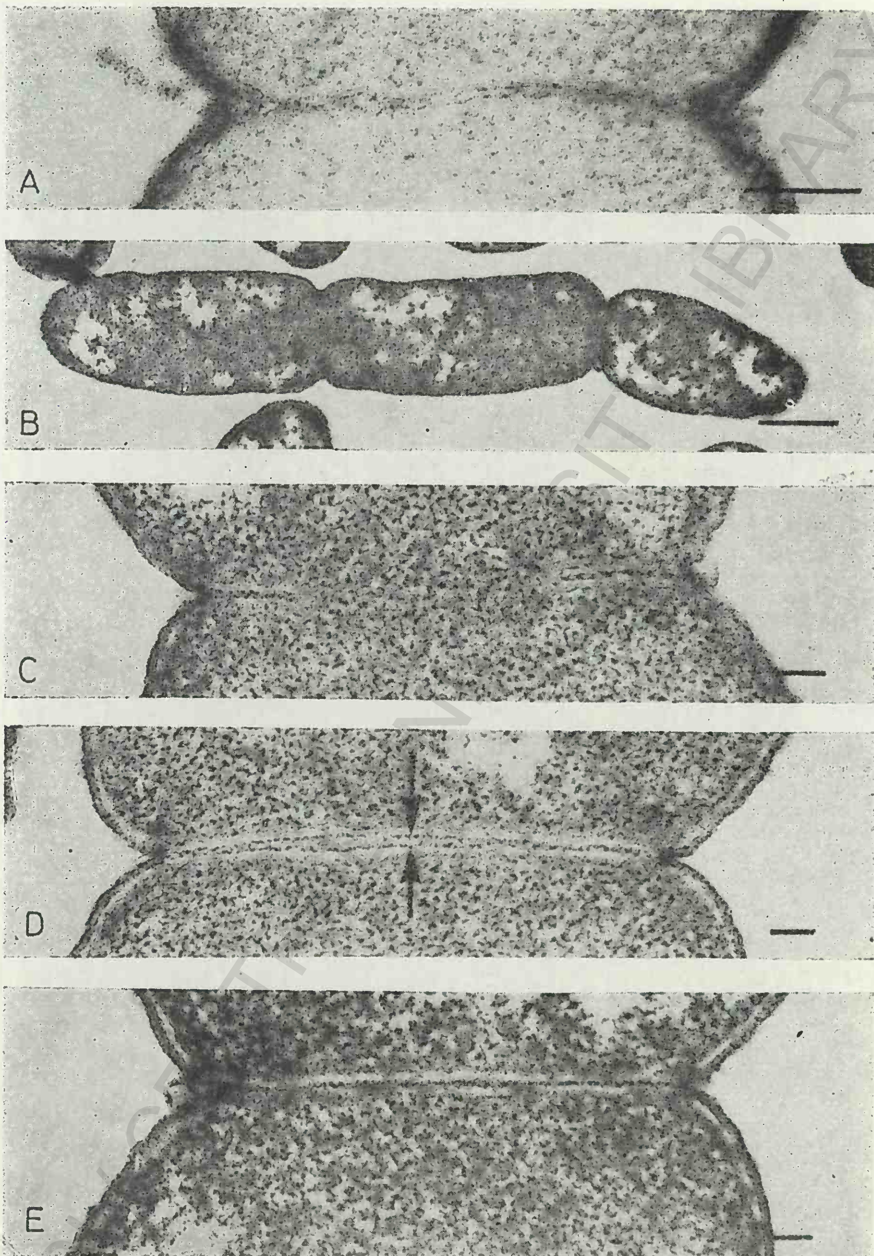




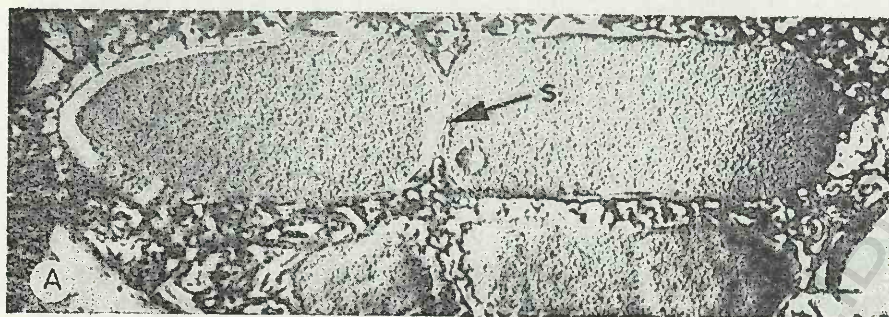




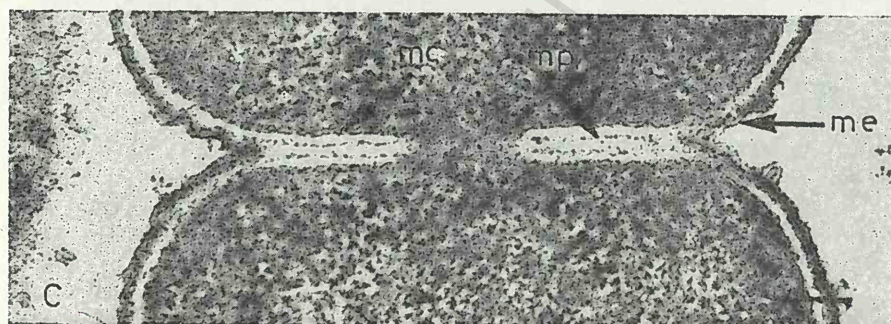
Pl. 34 — Secţiuni ultrafine prin celule de *E. coli* B (A, C) cultivate pe mediul săruri minerale — glucoză şi *E. coli* B/r cultivate pe mediul minimal — glucoză (B) şi glucoză— acizi cazaminici (D). Săgeţile nemarcate indică porţiunea mucopeptidică a septului (mp). Se observă veziculele derivate din membrana externă (me) (A, B), şi lamelele duble ale mucopeptidului septal. Barele = 0,1 μm (după Burdett şi Murray, 1974).

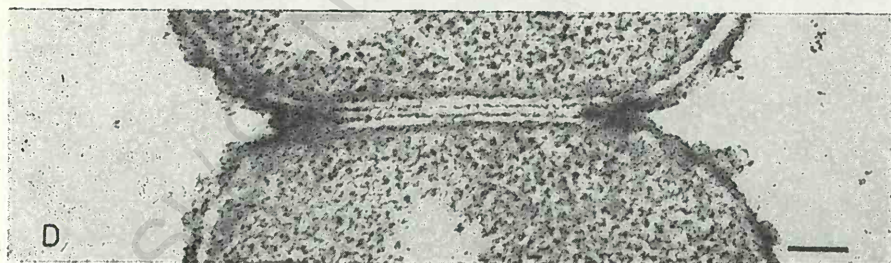


Pl. 35 — Septarea la *E. coli* B/r după cultivare în glucoză — acizi cazaminici și la *E. coli* D 22. Septul este format din membrana plasmatică (A) sau prin creșterea concomitentă a membranei plasmatice și a stratului mucopeptidic (C — E). Stratul mucopeptidic este dublu lamelar (D) sau unic (E). Tulpina de *E. coli* D 22 formează lanțuri de celule (B) (după Burdett și Murray, 1974). Barele = 0,1 μm; B = 1,0 μm.

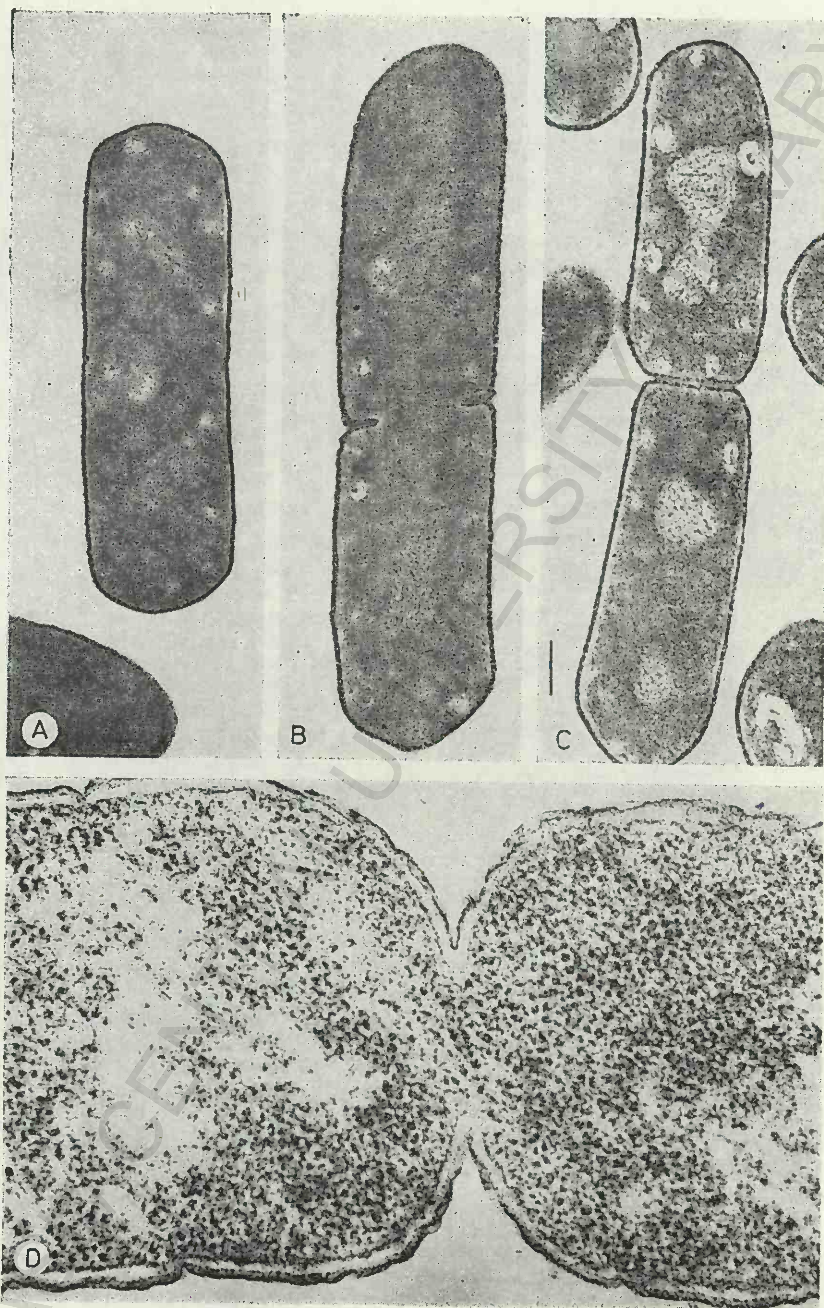




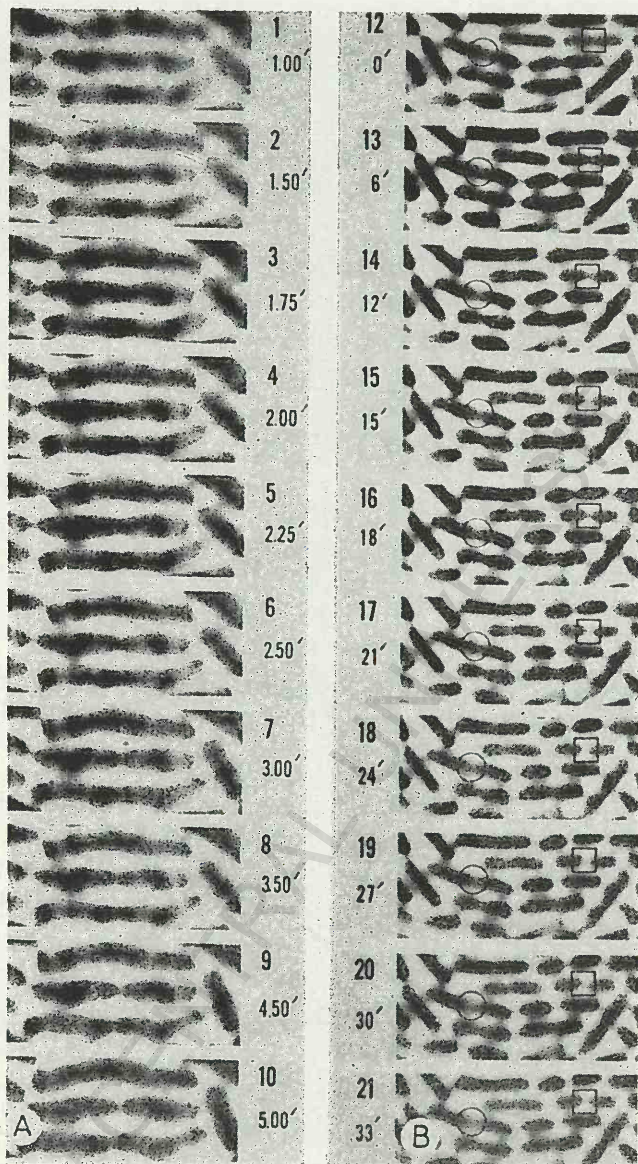




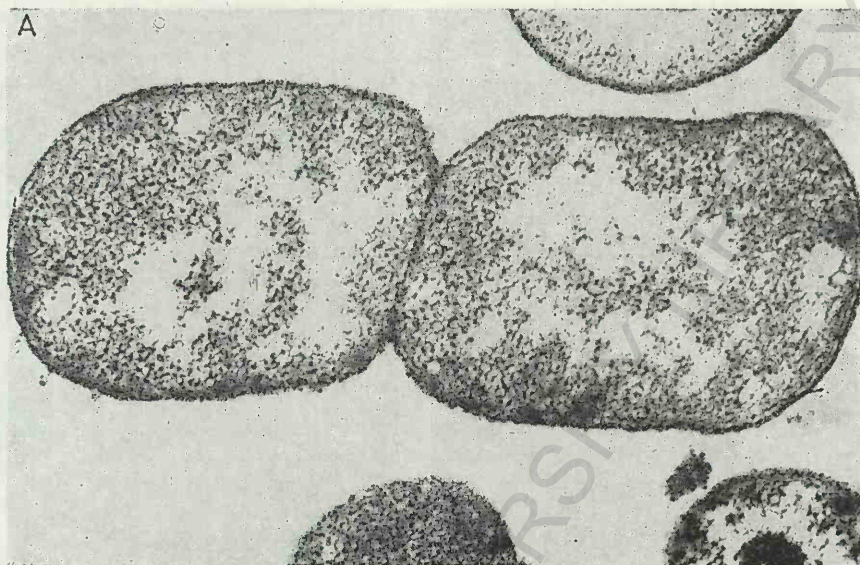
Pl. 36 — Microelectronografia regiunilor septale (s) ale structurilor membranare de tipul mezosomilor (m) la *E. coli* D 22 (**A**, **B**) (tehnica înghețare—fracturare). Separarea parțială (**C**) și completă (**D**) în cursul diviziunii *E. coli* CRT: me— membrana externă; mc —membrana citoplasmatică; mp — mucopeptid (după Burdett și Murray, 1974). Barele=0,1 μm; **A** = 0,5 μm).



Pl. 37 — Ciclul celular la *B. subtilis*. **A.** Inițierea septului transversal; prezența a doi nucleosomi. **B.** Dezvoltarea septului continuă în timp ce începe separarea celulelor-surori; nucleosomii apar mai alungiți. **C.** Celulele s-au divizat, separarea lor este aproape completă; într-una din celule, nucleosomii au aspect de haltere, în timp ce în cealaltă par segregați. Bara = 0,2 μm (după Nanninga și colab., 1979). **D.** Diviziunea prin strangulare a bacteriilor Gram-negative. Celule de *E. coli* tulpina D 21. Microelectronografia evidențiază participarea tuturor straturilor învelișului celular la procesul de invaginare concentrică (după Normark, 1974).

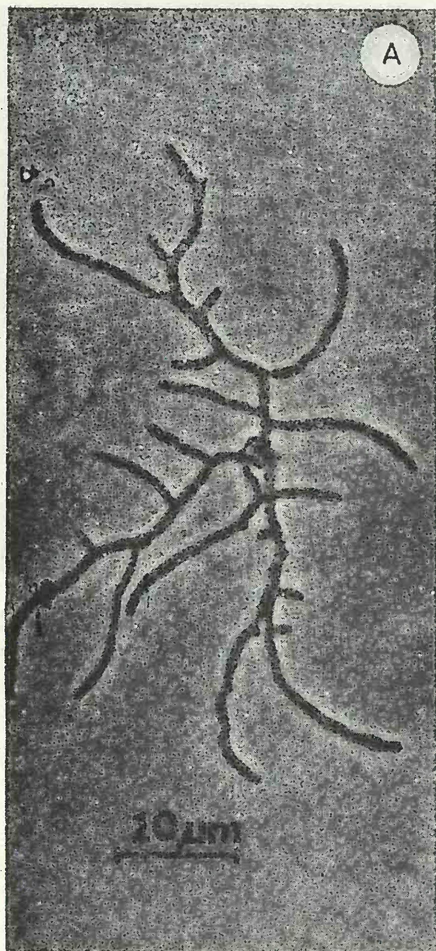


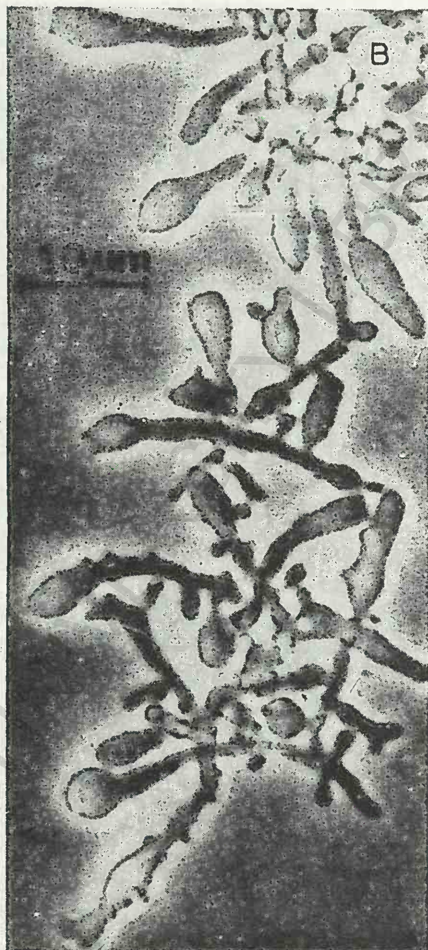
Pl. 38 – Creşterea şi diviziunea la *E. coli* urmărită prin microfotografie la intervale de timp. A. Microcultură la 37°C, fotografiată la intervale de 25 secunde. Au fost alese imagini dintr-o perioadă de 5 minute selecţionate pentru a evidenţia diviziunea unei celule localizate central, pe durata a patru generaţii. B. Microcultură la 43,5°C, fotografiată la intervale de 3 minute. Celulele sînt la a noua generaţie. Celulele marcate în pătrate sînt complet separate, în timp ce cele marcate prin cercuri se divid, dar rămîn încă strîns legate după 21 minute. Microscopie în contrast de fază întunecat (după Hoffman şi Frank, 1965).

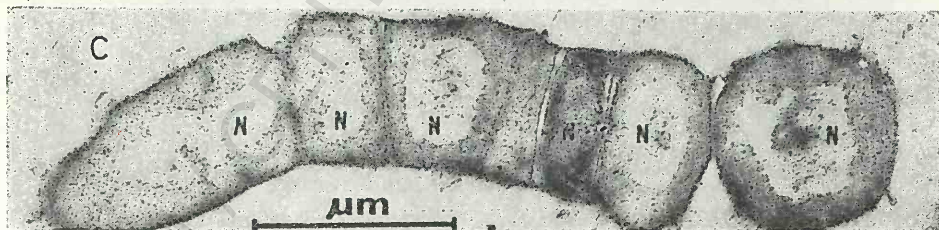




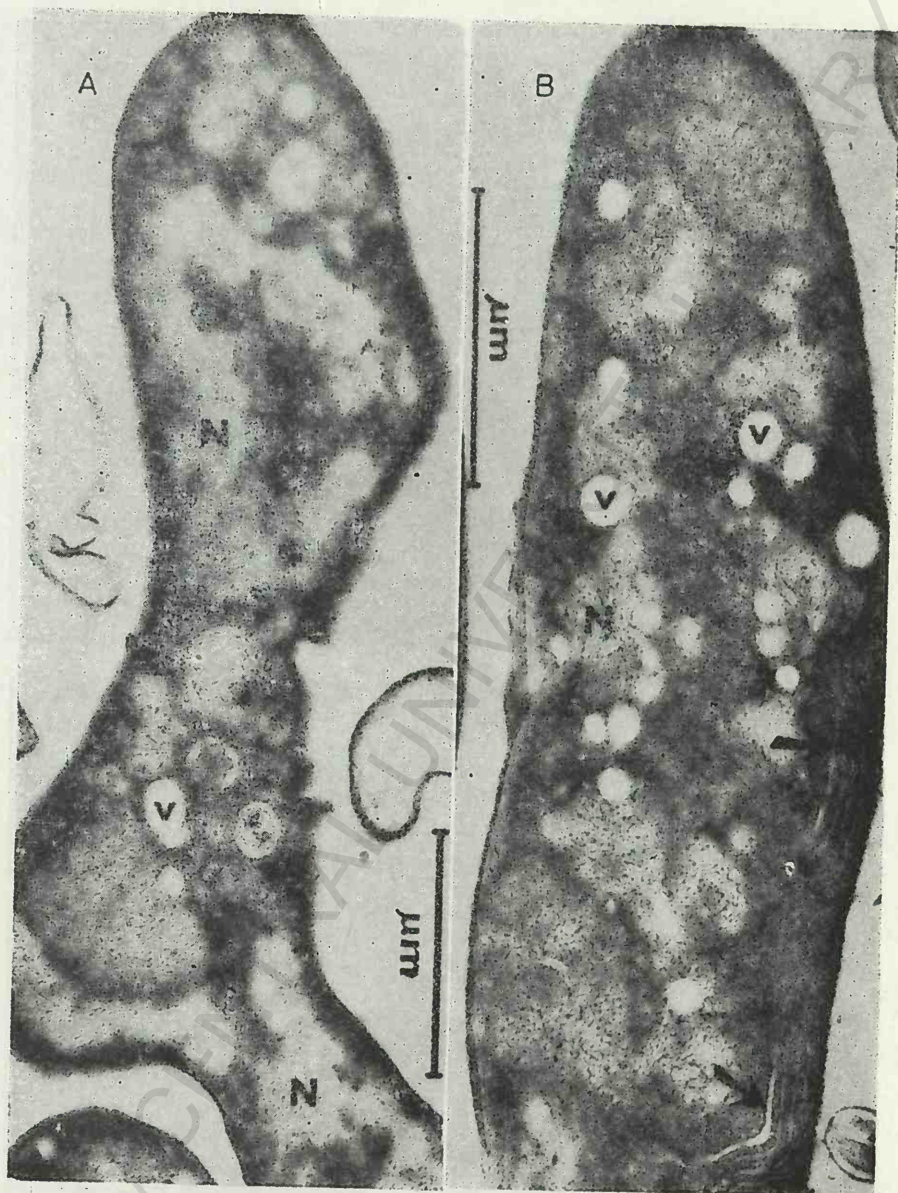
Pl. 39 — Creșterea și multiplicarea la *E. coli*. Microelectronografia unor secțiuni ultrafine, evidențiind sfîrșitul diviziunii celulare (A) și ultrastructura septului transversal (B) (după Burdett și Murray, 1974).



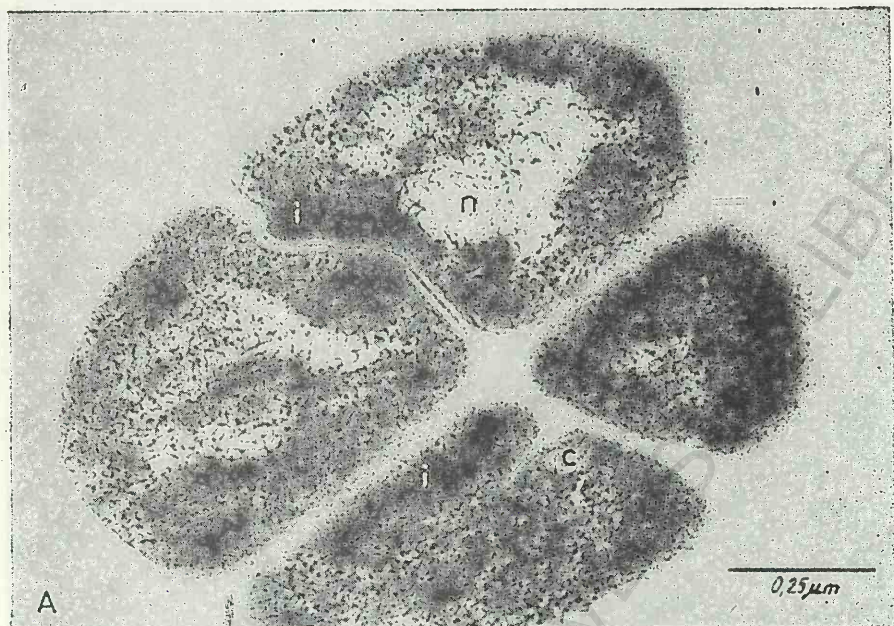


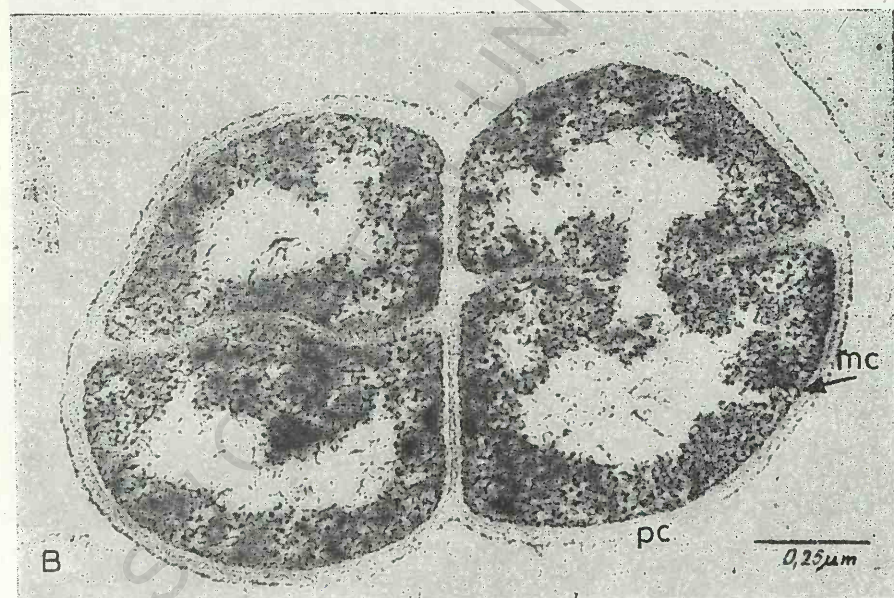


Pl. 40 — Creşterea la *Nocardia*, tulpina 721—A (probabil *N. corallina*) după 12 ore la 30°C pe agar nutritiv (A) şi pe agar—infuzie de creier şi inimă (B). Micrografie în contrast de fază. **C.** Microelectronografia unei secţiuni ultrafine prin *N. corallina*, evidenţiind un filament care a fost divizat în unităţi cocoide avînd regiunile nucleare (N) distincte şi separate (după Beaman şi Shankel, 1969).

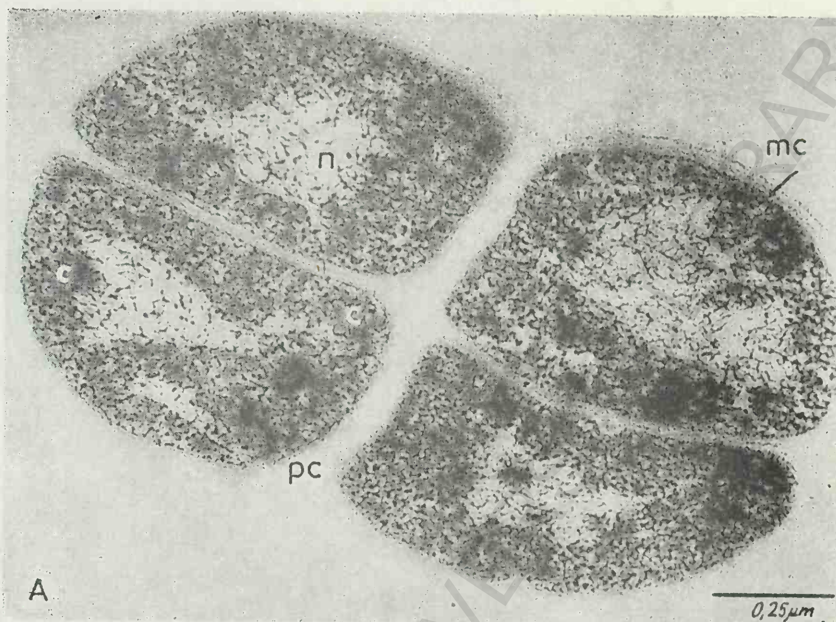


Pl. 41 — Secţiune ultrafină prin celule de *Nocardia*, evidenţiind straturile paralele de membrane (→); N—regiunea nucleară; V—acumulări de lipide (după Beaman şi Shankel, 1969).



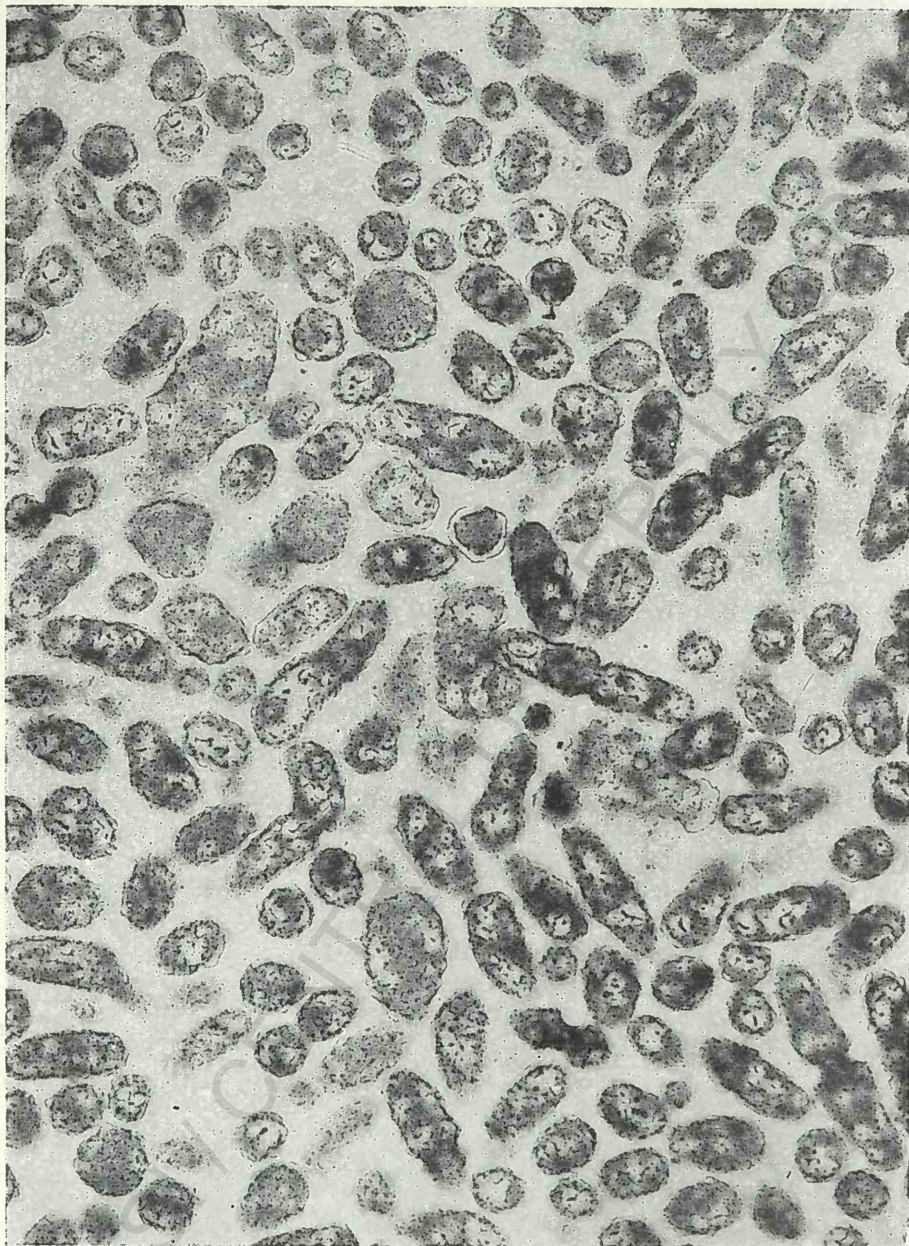


Pl. 42 — Multiplicarea la *Sporosarcina ureae.* Microelectronografie pe secţiuni ultrafine prezentînd stadii în diviziunea celulară: pc — peretele celular; mc — membrana citoplasmatică; n—material nuclear; c—citoplasmă; i—incluziuni (după Mazanec şi colab., 1965).

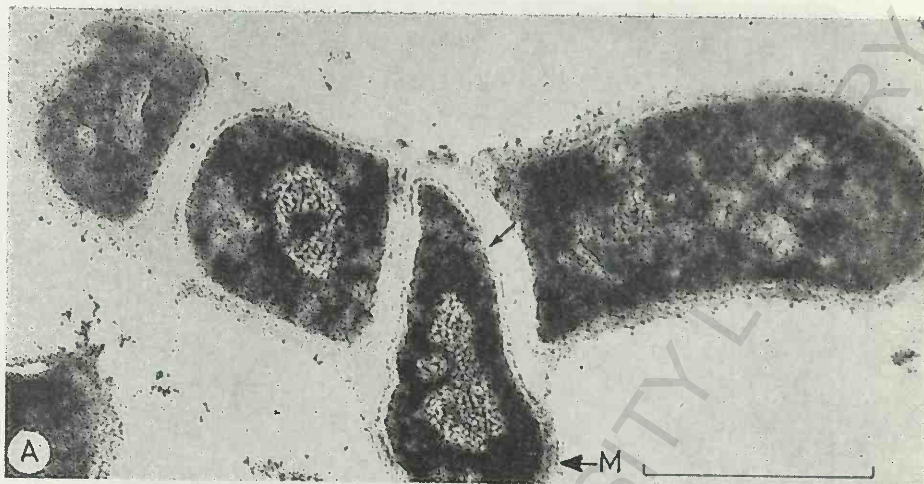




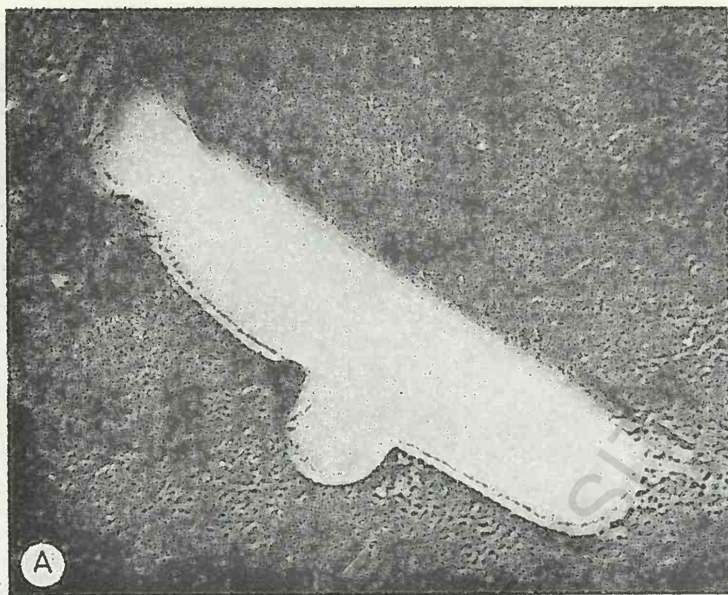
Pl. 43 — Multiplicarea la *Sporosarcina ureae*. Microelectronografie pe secţiuni ultrafine, prezentînd stadii ulterioare în diviziunea celulară faţă de cele din pl. 42: pc — — perete celular; mc — membrana citoplasmatică; c — citoplasma; n — material nuclear; i — incluziuni (după Mazanec şi colab., 1965).

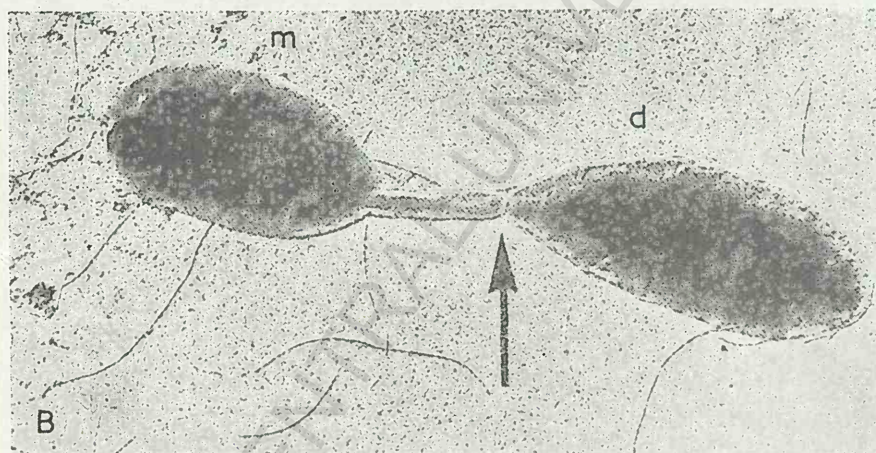


Pl. 44 — Creşterea şi diviziunea rickettsiilor. Microelectronografia regiunii centrale a unei colonii de *Rickettsia quintana* cultivată in vitro. Formele alungite sînt secţionate longitudinal, iar cele circulare transversal. Mai multe celule sînt în stadiul de diviziune prin constricţie (după Ito şi Vinson, 1965).

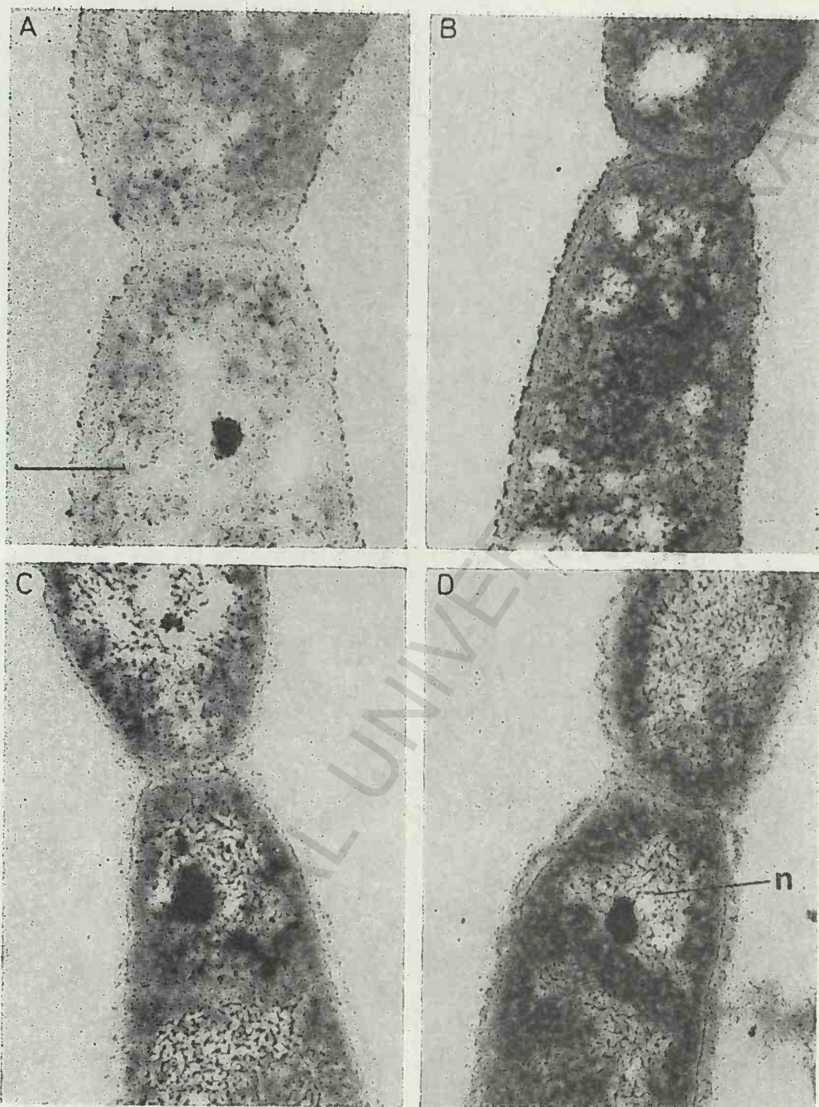


Pl. 45—A. *Actinomyces odontolyticus.* Celule în vîrstă de patru zile, pe cale de a forma un mugure (M). Se observă peretele celular gros format din material granular. Săgeata indică o mică invaginare membranară. Bara = 1,0 μm (după Duda și Slack, 1972).
B. *Pasteuria* sp. Două celule atașate prin crampoane situate la polul proximal pe suprafața unei diatomee. Una din celule este în curs de înmugurire la extremitatea sa distală (după Staley, 1981).

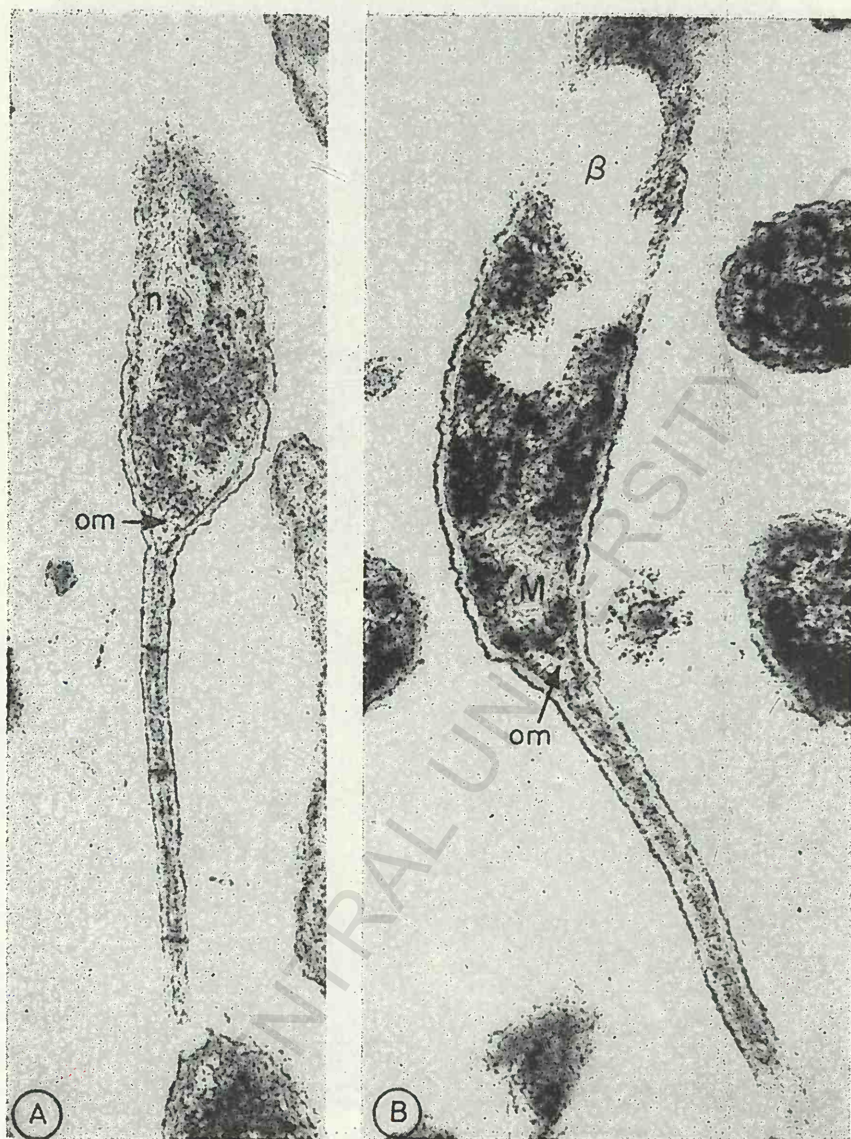




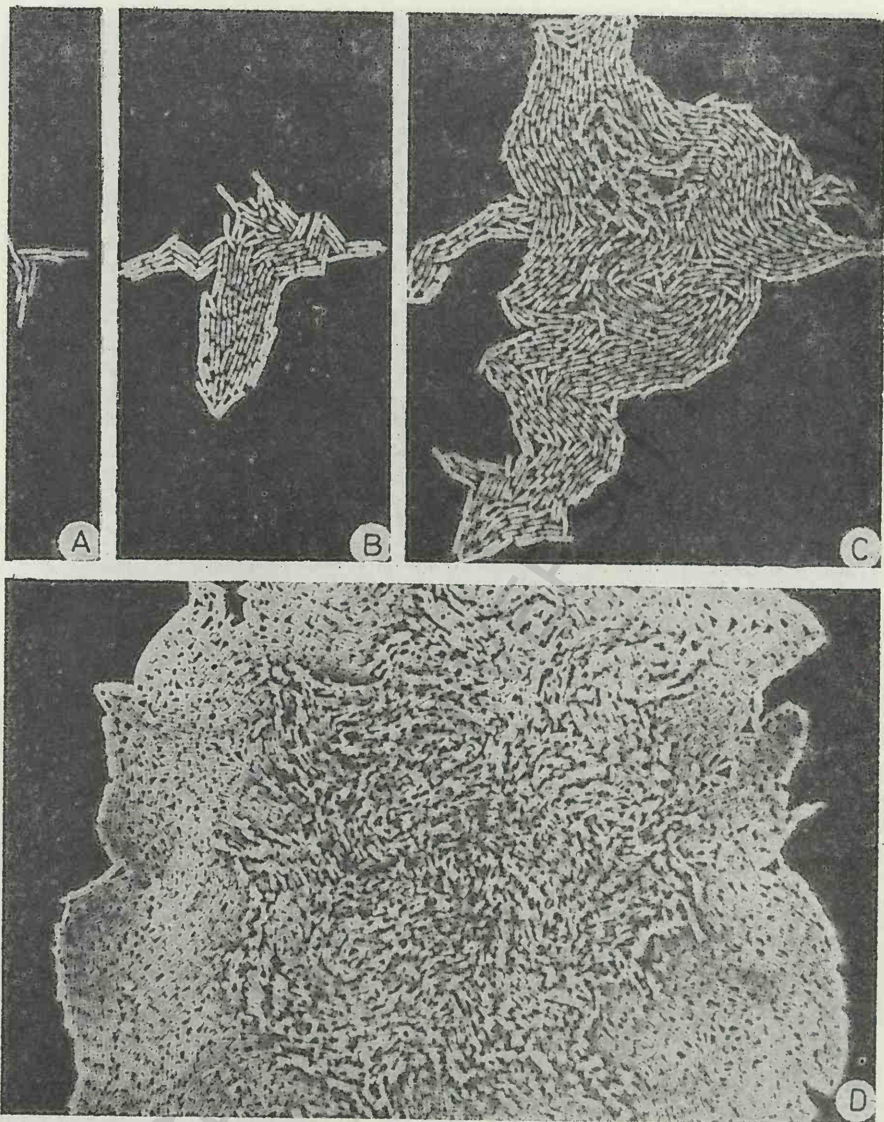
Pl. 46 — **A.** Bacterie cilindrică în curs de înmugurire laterală și terminală (după Scanga, 1959). **B.** Multiplicarea la *Rhodomicrobium vannielii.* Microelectronografia evidențiază diviziunea celulei într-un „ciclu simplificat", avînd ca rezultat formarea unei celule-mamă pedunculată (m) și o celulă-fiică (d) fără peduncul (după Whittenbury și Dow, 1977).



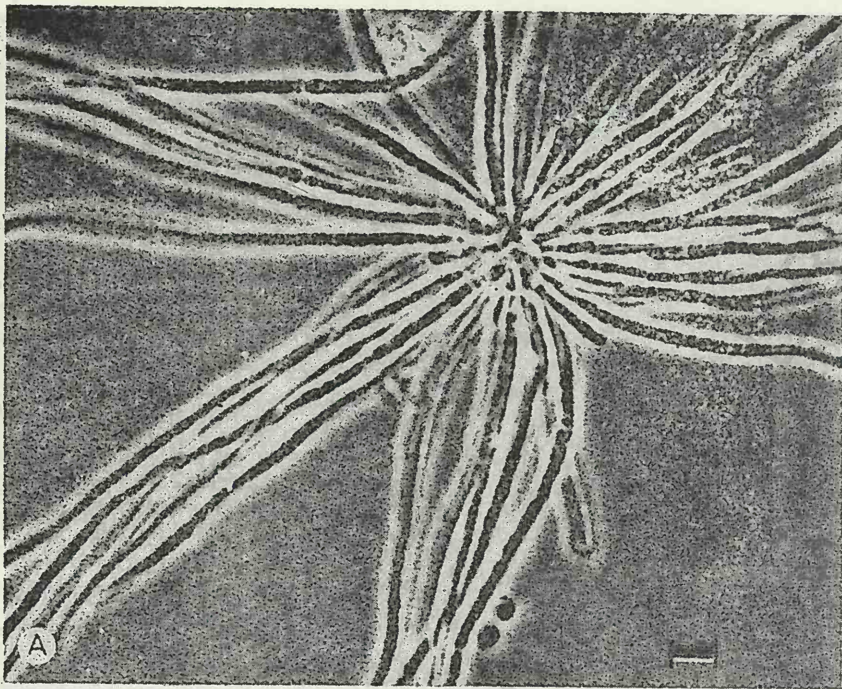
Pl. 47 — Diviziunea bacteriilor prostecate: *Asticcacaulis biprosthecum*. Evidențierea fazelor succesive după două tehnici diferite (**A — B**, **C—D**); n—regiunea nucleoplasmei (după Poindexter și Hagenzieker, 1981). Bara = 200 nm.

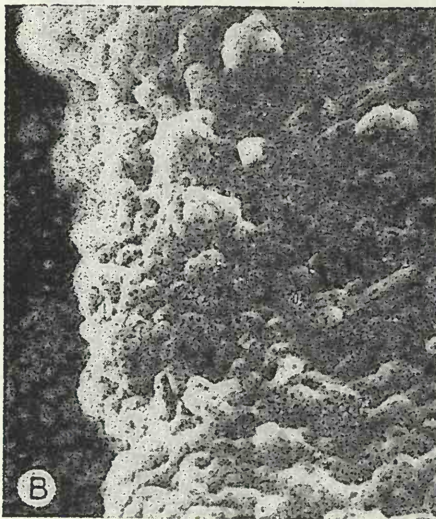


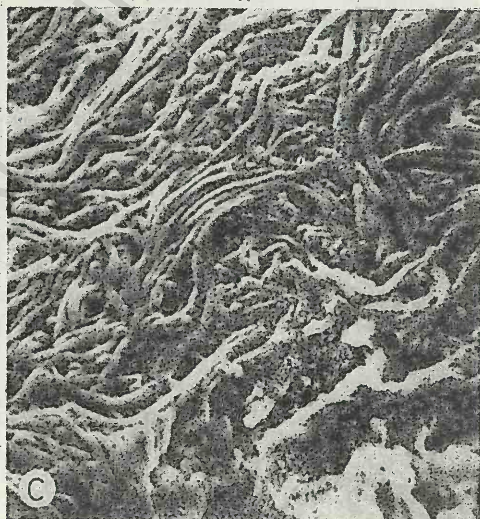
Pl. 48 — Multiplicarea bacteriilor prostecate. Celule de *Caulobacter crescentus*. Se văd septurile transversale care marchează numărul înmuguririlor anterioare și vîrsta bacteriei-mamă: n — nucleoplasmă; M — mezosom; β — incluziuni de poli-β-hidroxi-butirat; om — organit membranos (după Schmidt și Stanier, 1966).



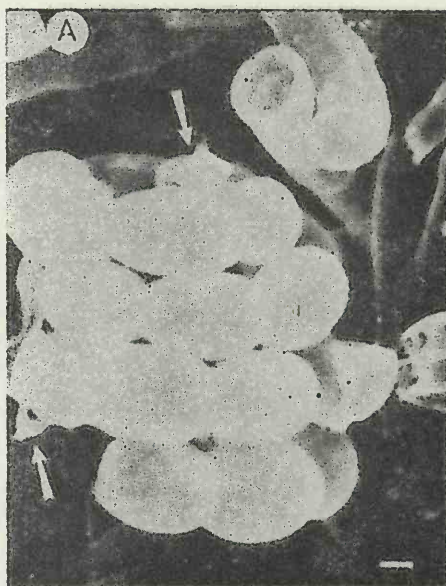
Pl. 49 — Diviziunea sincronă într-o microcolonie clonală de *E. coli*. **A.** După 80 minute de la însămînțare, microcolonia conține celule din generația a treia și a patra. **B.** Microcolonie cu celule la începutul generației a șaptea (după 155 min). **C.** Microcolonie în generația a noua; 15% din celule nu sînt evidențiate. **D.** Microcolonie după 5 ore și 25 minute, conținînd celule în generația a 14-a; în centrul coloniei celulele sînt suprapuse (după Hoffman și Frank, 1965).

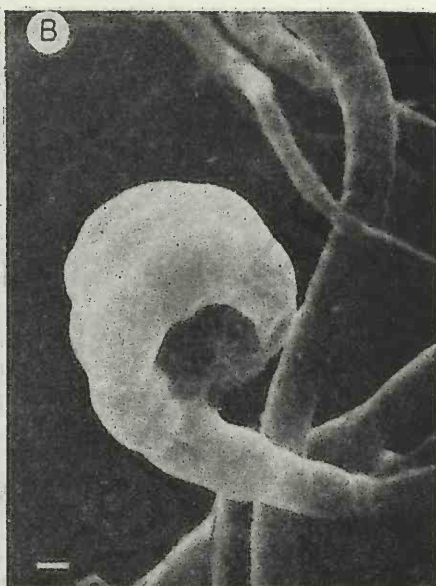


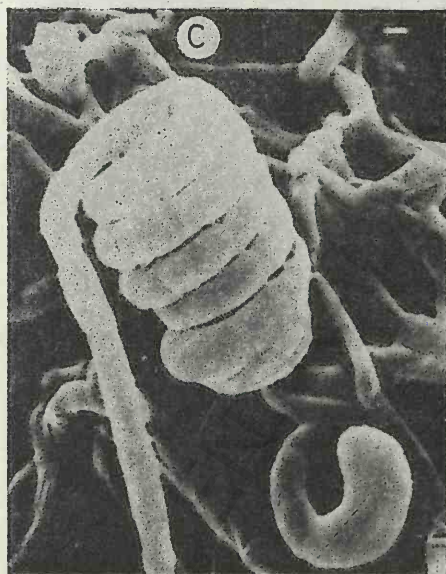


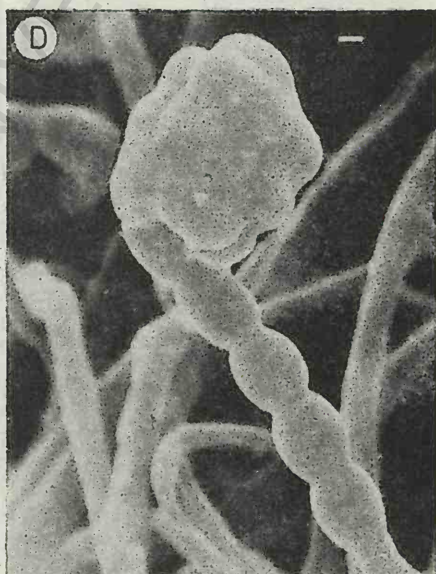


Pl, 50 — Bacterii care se înmulţesc prin gonidii. **A.** Rozetă formată din mai multe filamente de *Leucothrix mucor* (fotografie în contratt de fază) (după Brock, 1981). Bara = = 10 µm. **B.** Microstructura coloniilor bacteriene de *Lactobacillus casei* **C.** *L. fermenti.* Microelectronografie în scanning (după Drucker, 1972).

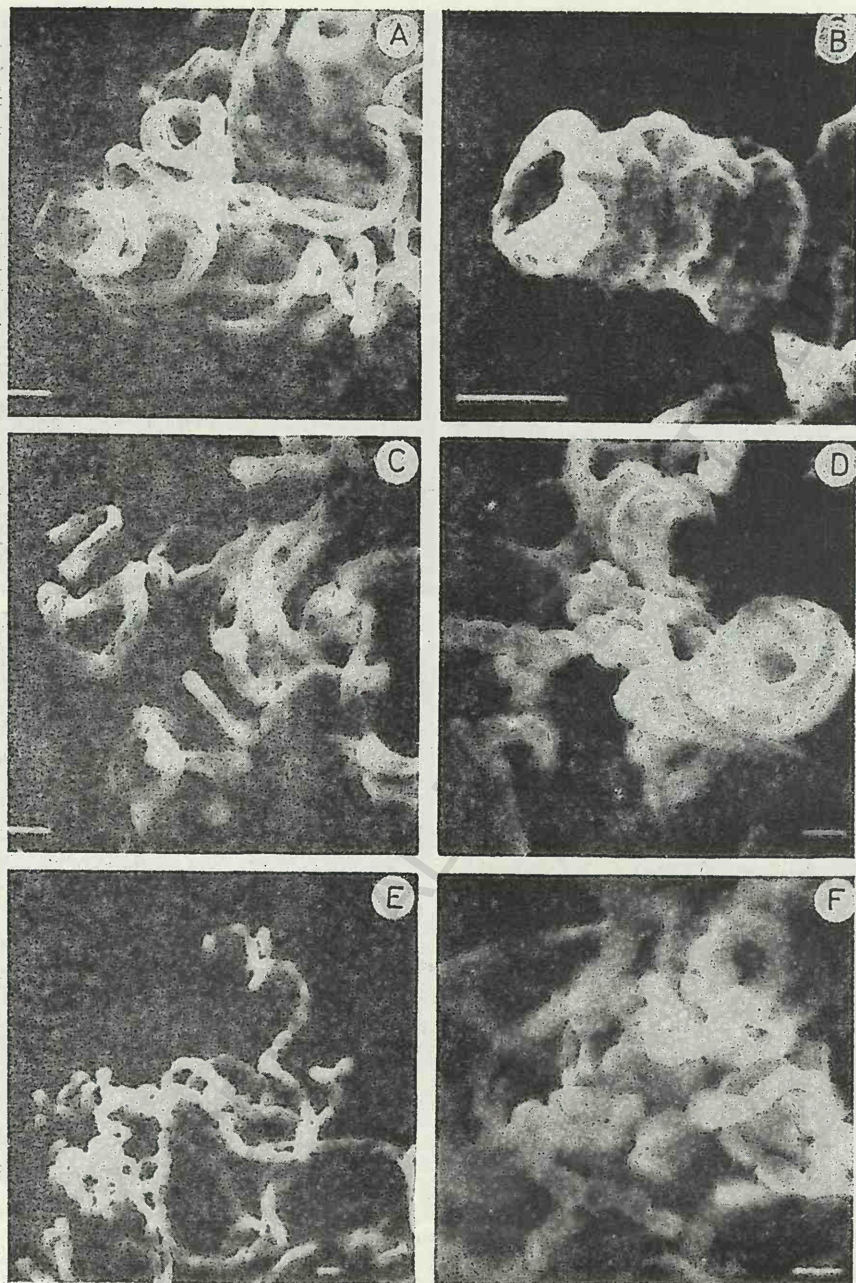




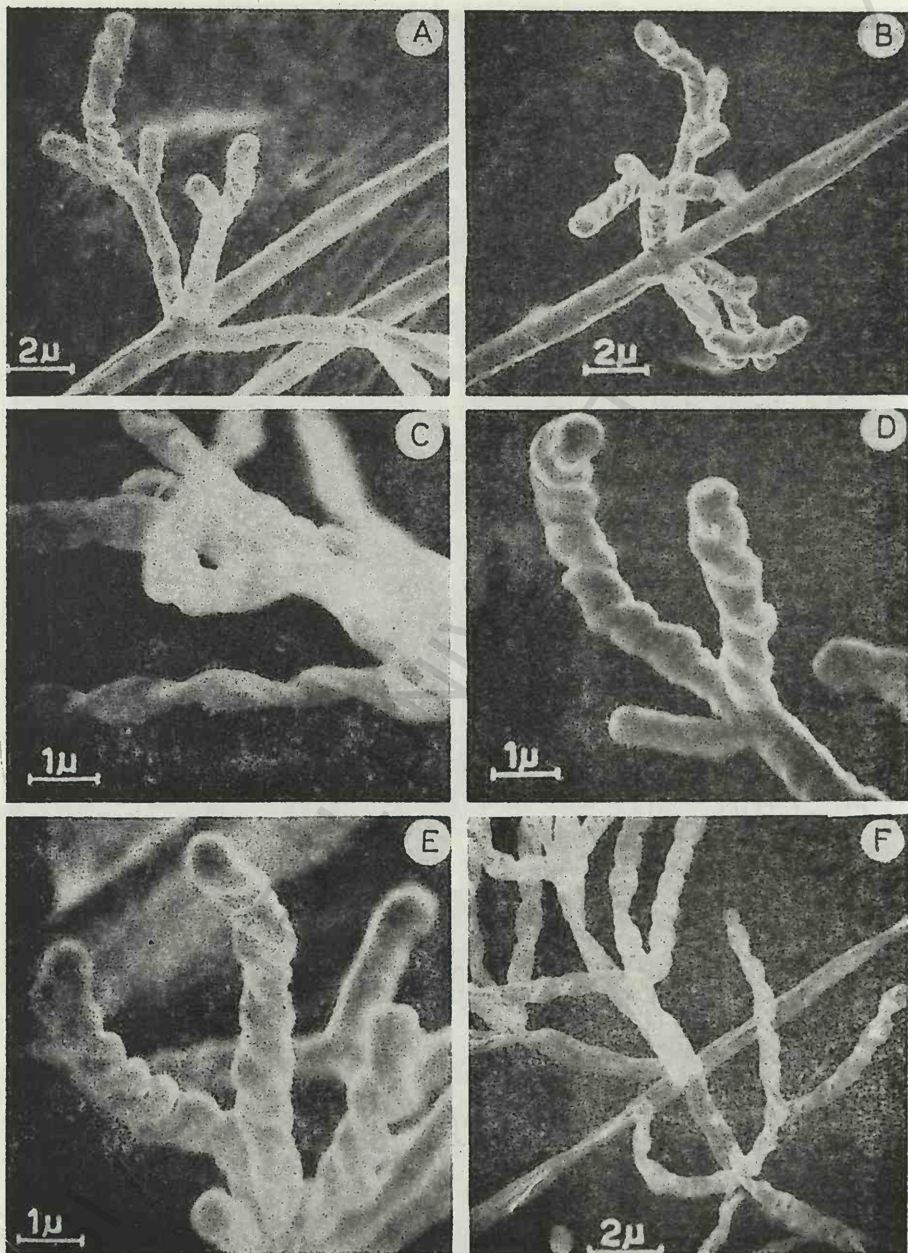




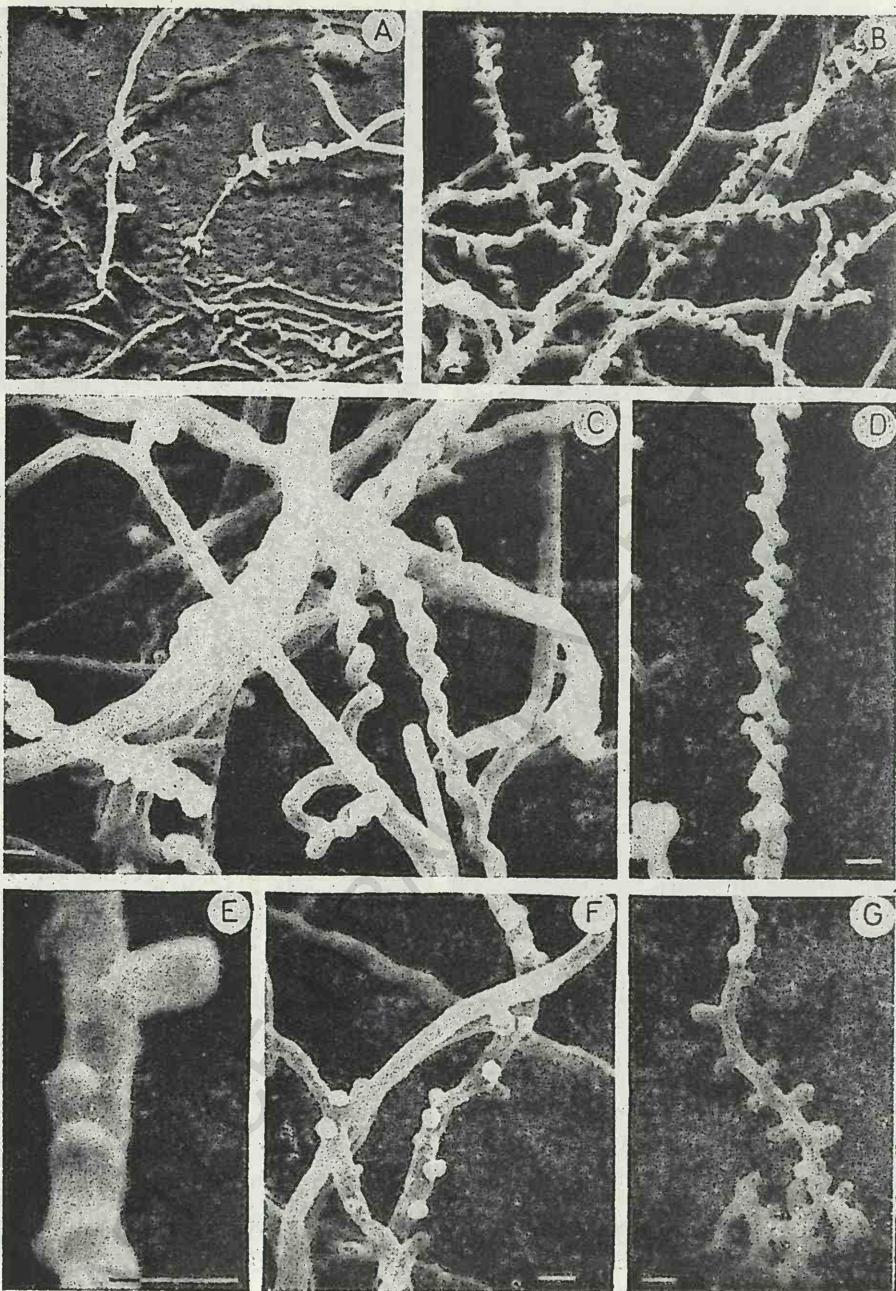
Pl. 51 — *Streptomyces ipomaea*. Imaginea sporangiului la microscopul electronic cu scanning. **A.** Membrana a fost îndepărtată; resturile ei sînt marcate cu săgeți. Lanțurile de spori sînt menținute datorită formei lor spiralate. **B.** Sporangiu golit de spori, evidențiind teaca. **C.** Hifă sporogenă strîns spiralată. **D.** Lanț de spori purtînd în regiunea apicală o structură similară unui sporangiu (după Clark și Lawrence, 1981).



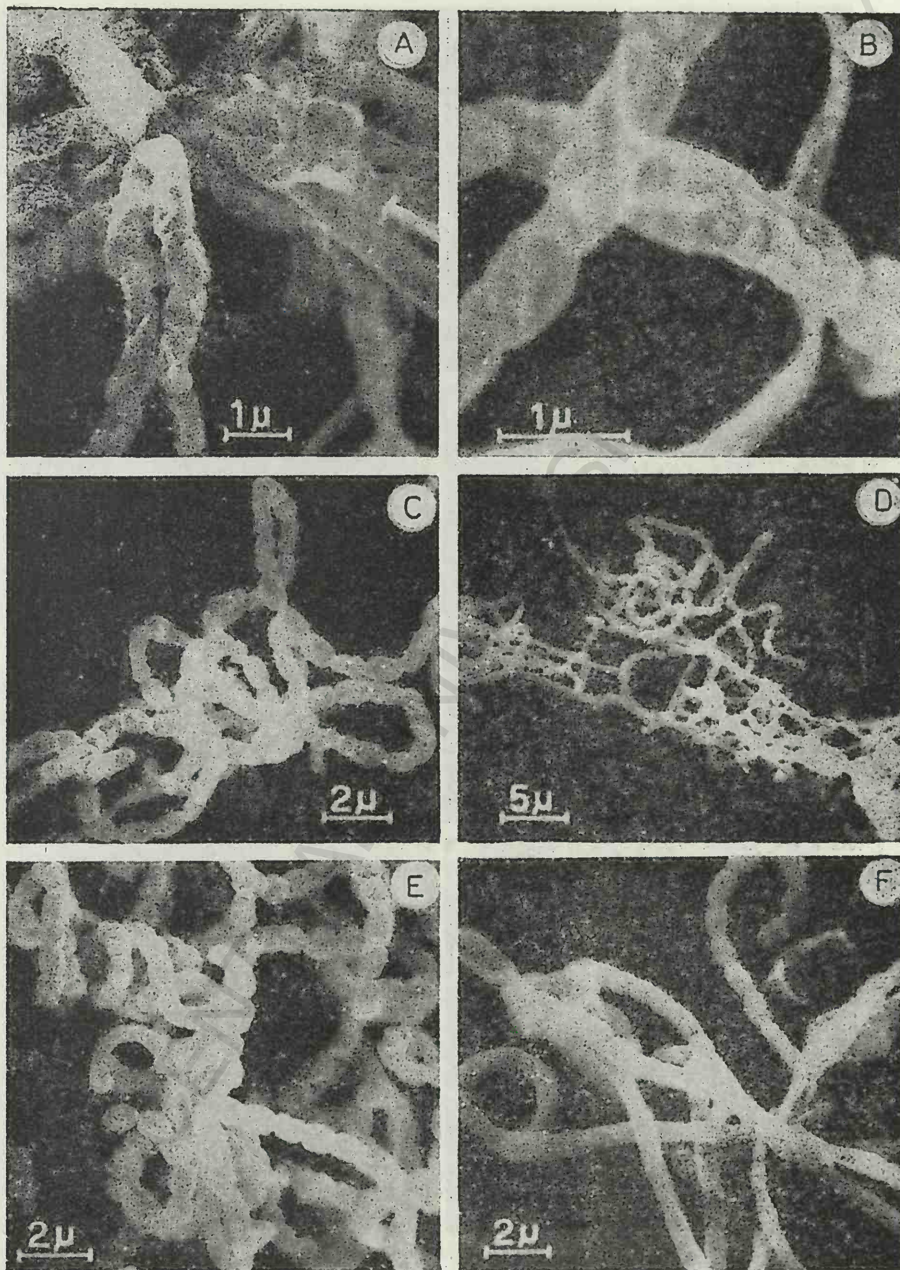
Pl. 52 — *Streptomyces caespitosus*. Stadiile succesive de dezvoltare a sporoforului (după Locci şi Baldan, 1971).



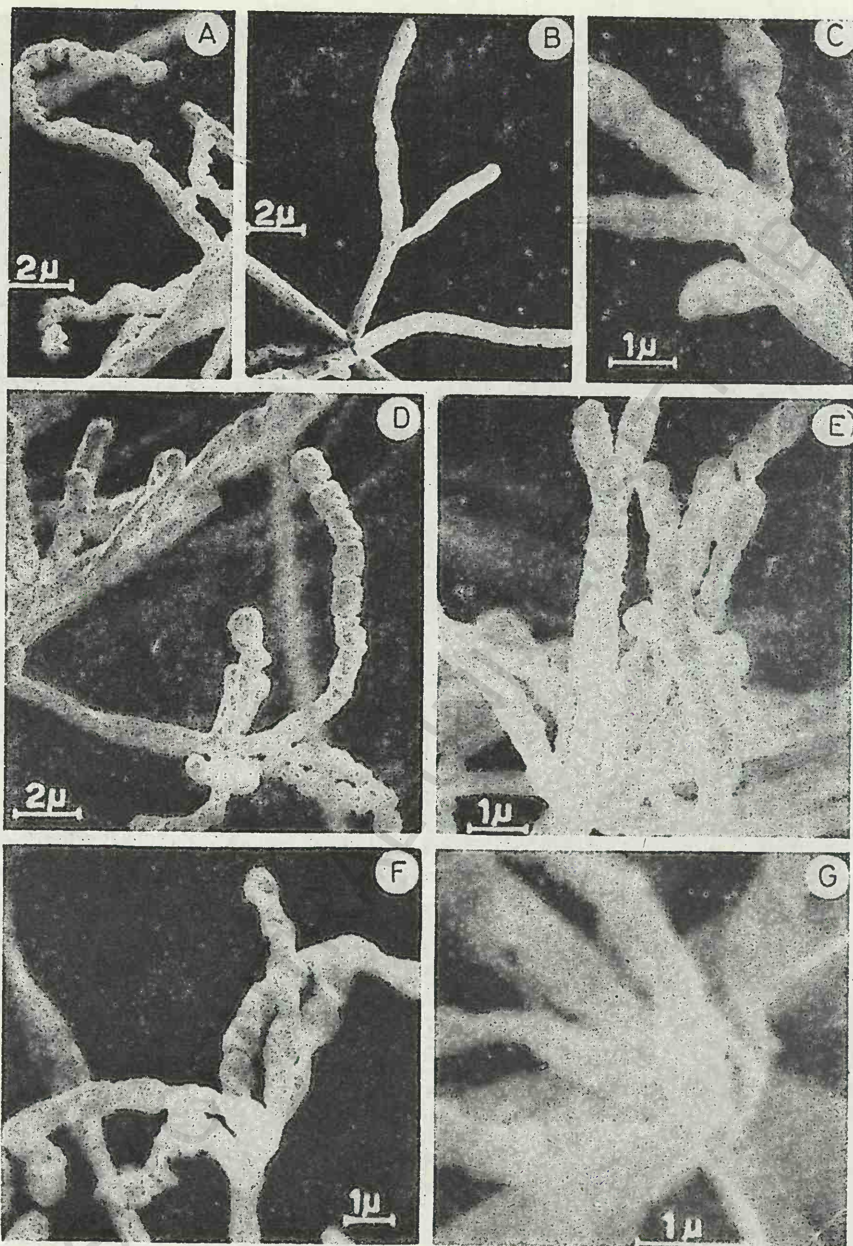
Pl. 53 — Sporularea la actinomicete. Răsucirea hifelor sporofore înainte de sporulare (A—F) şi formarea efectivă a sporilor (C, E). **A, B, D, E.** *Streptomyces salmonis*. **C, F.** *S. kentuckense* (după Locci şi Baldan, 1971).



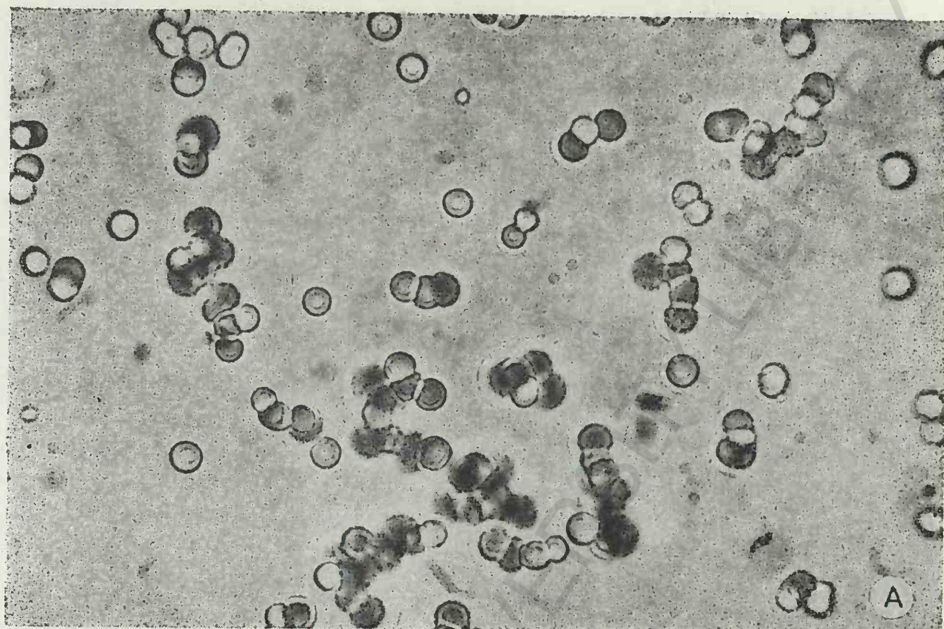
Pl. 54 — *Thermomonospora viridis.* Aspectul miceliului (A) şi apariţia sporoforului (B). Stadiile de dezvoltare includ spiralarea şi răsucirea strînsă a regiunii apicale a hifelor (C, D); apariţia primilor spori (E—G) (după Locci şi Baldan, 1971).

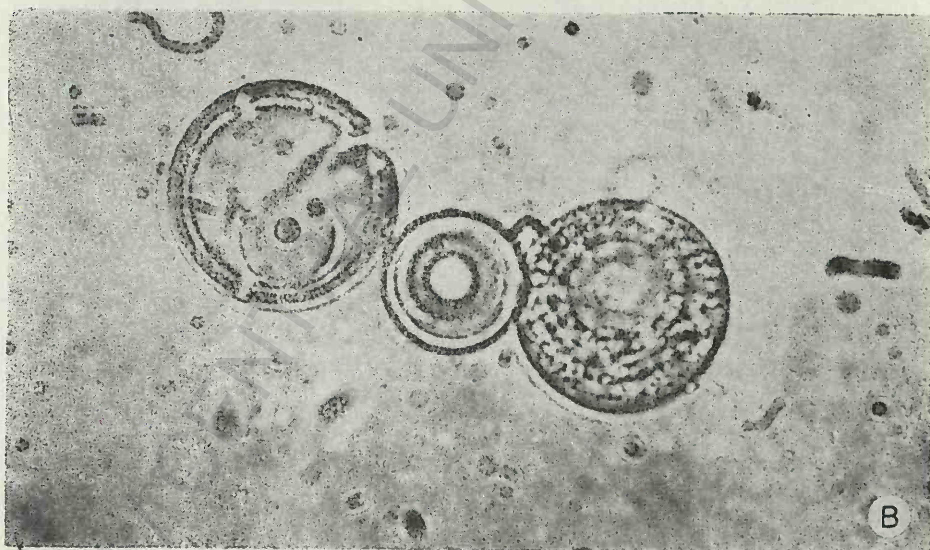


Pl. 55 — Lanțuri de spori la *Streptoverticillium baldaccii* (A, B) și aspectul structurilor sporulante la actinomicetele pseudoverticilate (C—F). C, D. *Streptomyces mediocidicus*. E. Str. *caespitosus*. F. *Actinomyces circulatus* (după Locci și Baldan, 1971).

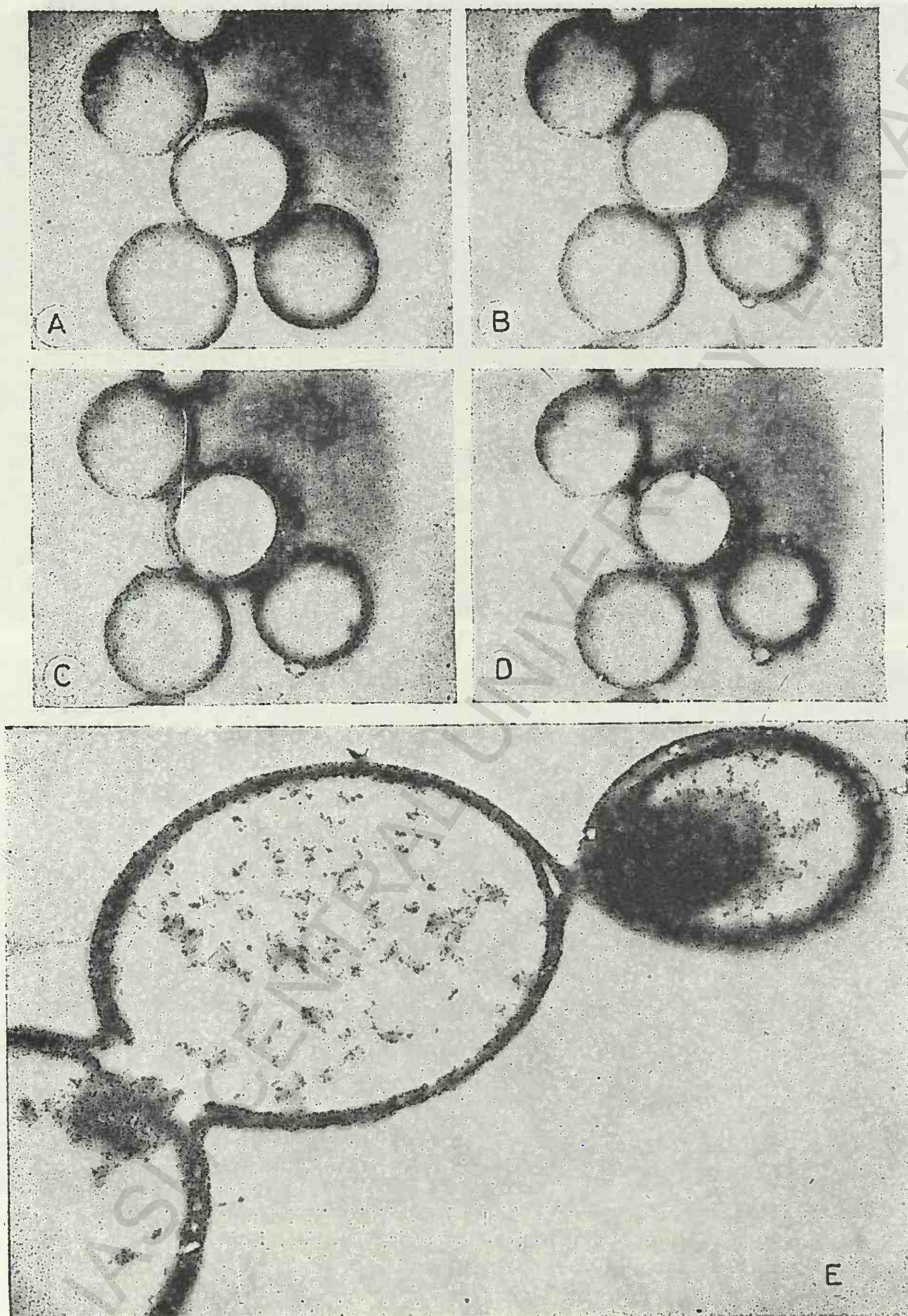


Pl. 56 — Sporularea la *Streptoverticillium*, evidențiind răsucirea hifelor sporofore și formarea sporilor. Pe suprafața unor sporofori se văd resturi ale membranei sporoforului pliate (după Locci și Baldan, 1971).

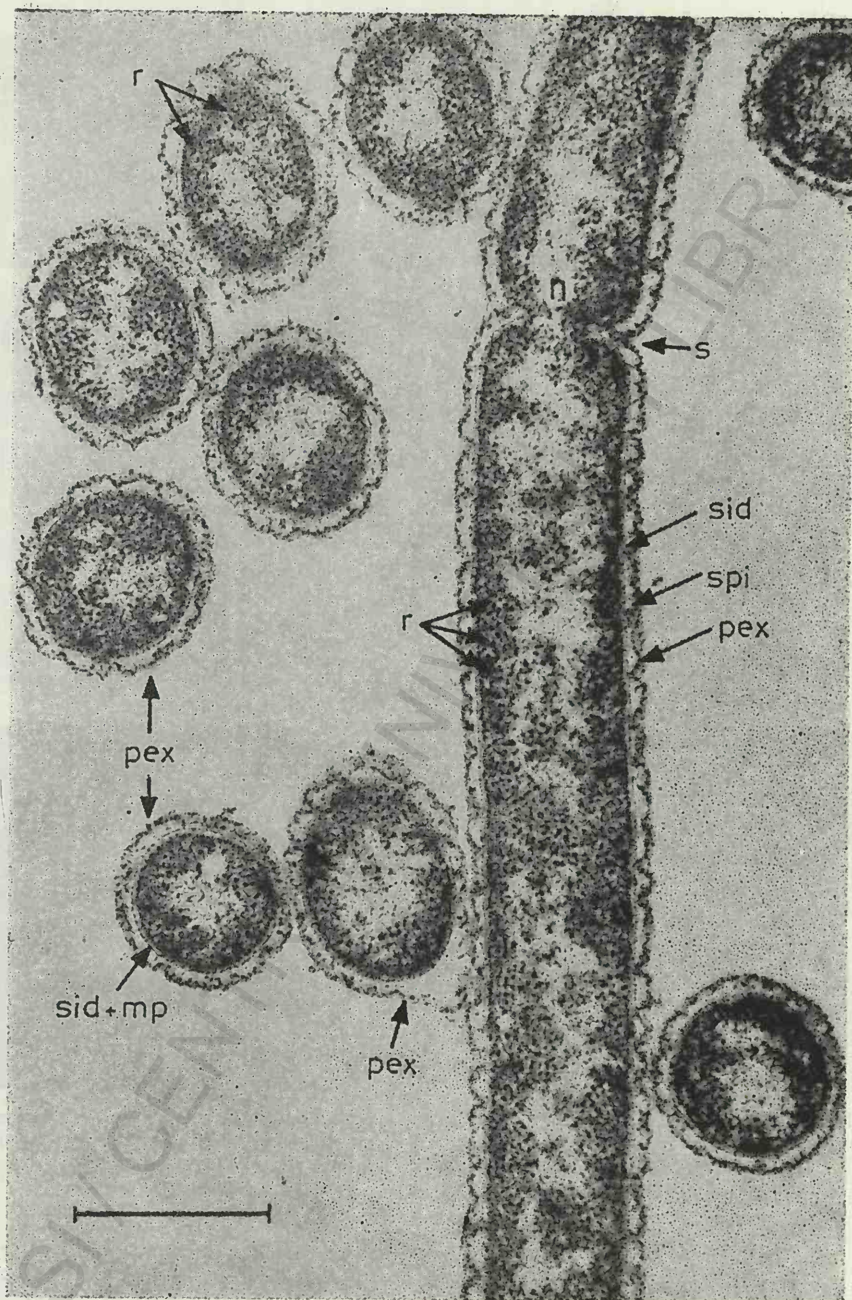




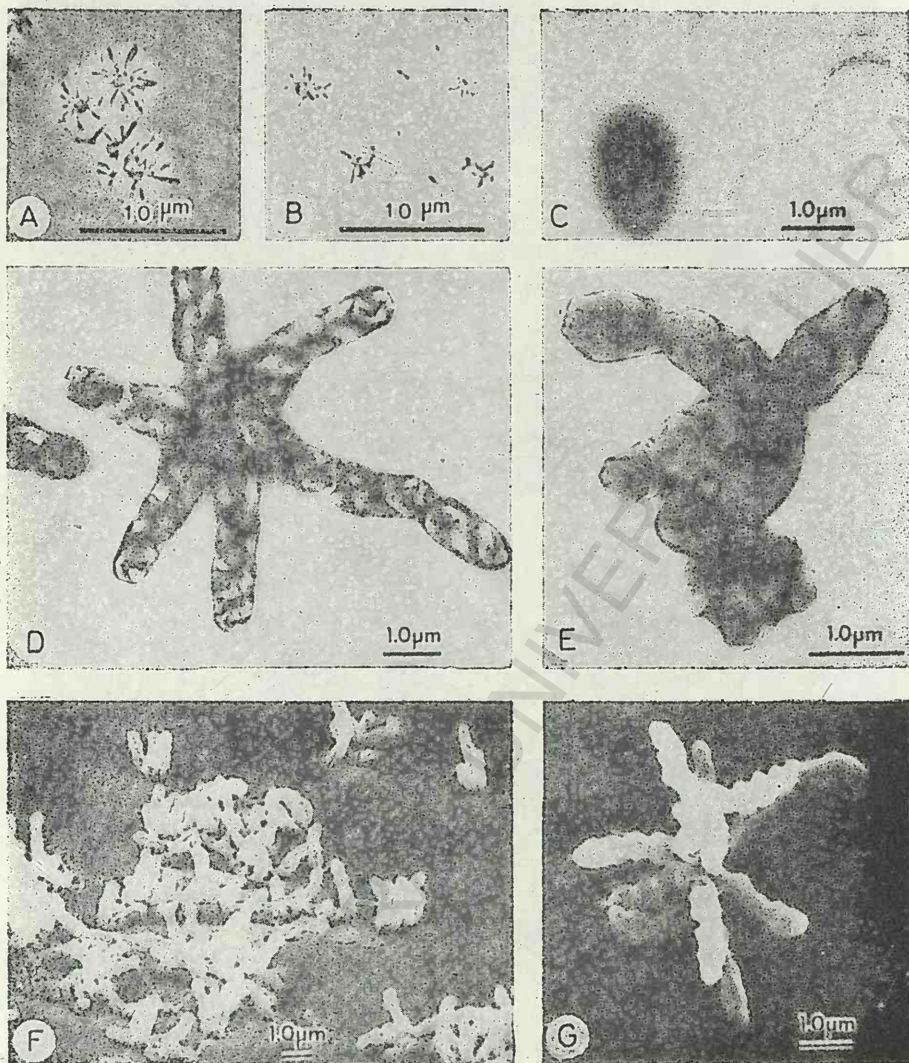
Pl. 57 — A. Microsfere de proteinoide (după Fox, 1967). B. Microparticule de proteinoide „cu muguri şi filamente" (după Fox, 1967).



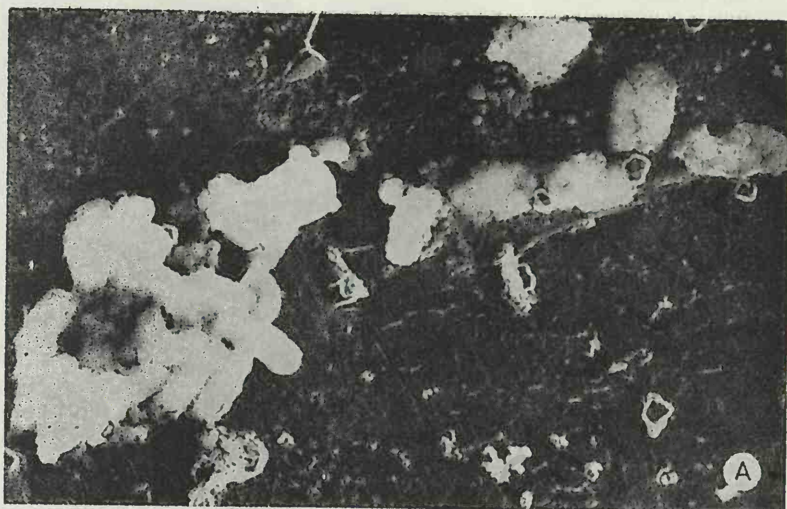
Pl. 58 — A —D. Formarea de „muguri" pe suprafaţa microsferelor de proteinoid. E. Proteinoide. Microsferă cu perete dublu (fixare cu tetraoxid de osmiu după expunere la pH alcalin) (după Fox, 1967).

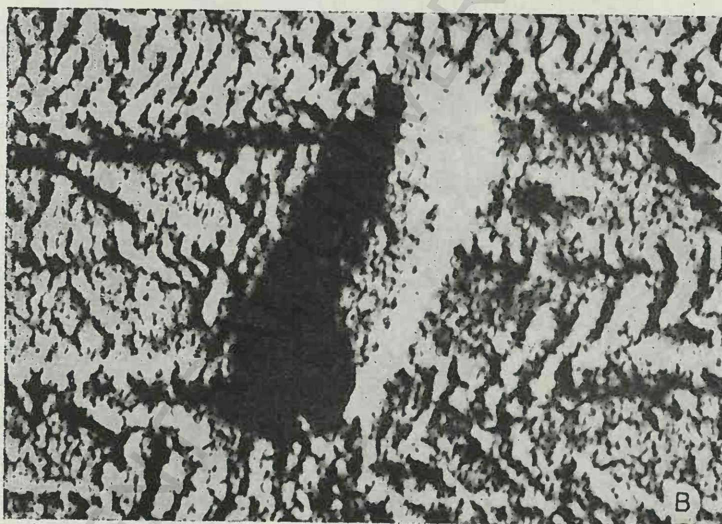


Pl. 59 — *Thermus aquaticus* în curs de diviziune prin strangulare (s). Microelectronografia unor secţiuni longitudinale, transversale şi oblice, evidenţiind nucleoplasma (n) cu fibrile fine, dense, de ADN, înconjurat de citoplasmă, care conţine numeroşi ribosomi (r). Învelişurile celulare sînt formate din membrana plasmatică (mp) şi peretele celular alcătuit din stratul extern dens (pex), stratul parietal intermediar (spi) şi stratul intern dens (sid). În zona în care două celule sînt în contact, stratul extern este separat de cel intern, care rămîne aderent de membrana plasmatică. Bara = 0,5 μm (după Brock şi Edwards, 1970).



Pl. 60 — *Seliberia stellata*, diferite aspecte ale suprafeţei celulare şi ale modalităţilor de grupare în rozetă şi în formă stelată. Fotografii la microscopul fotonic (**A, B**), electronic cu transmisie (**C, D, E**) şi în scanning (**F, G**) (după Schmidt şi Swafford, 1981).



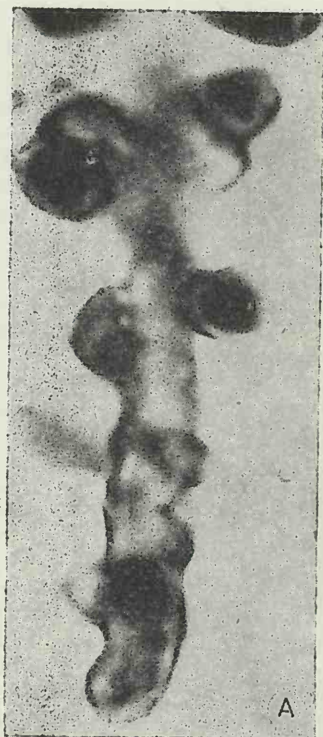


Pl. 61 — A. Microfosile bacteriene cu o vechime de aproximativ 2 miliarde de ani, păstrate în chertul din formaţiunea Gunflint (după Barghoorn, 1971). B. *Eobacterium isolatum*, bacterie fosilizată, păstrată din Precambrian, în formaţiunea Fig Tree, din Africa de Sud, cu o vechime de 3,2 miliarde de ani. Microelectronografia unei replici a suprafeţei probei de rocă, după umbrire cu metale grele (după Barghoorn, 1971).

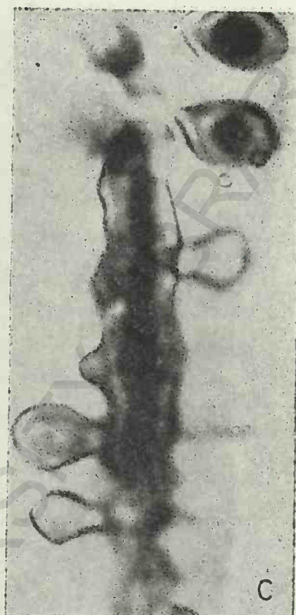


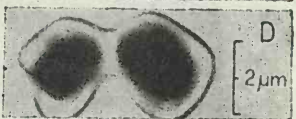
Pl. 62 — Microelectronografia unor secţiuni ultrafine prin celule de *Sulfolobus*, evidenţiind structura lobată a celulelor şi subunităţile de structură ale peretelui celular. Bara = 0,5 µm (după Weiss şi Brock, 1981).

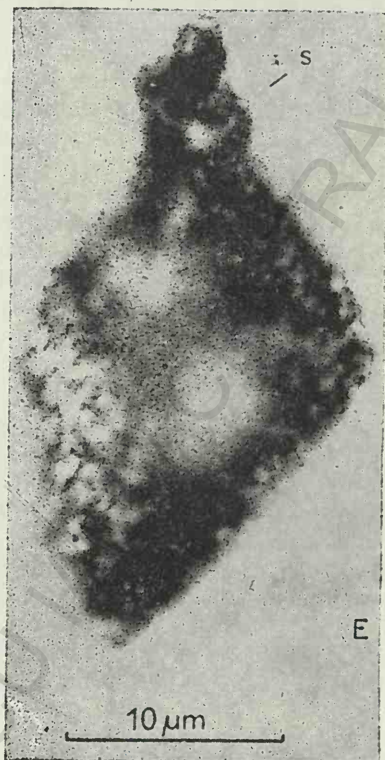
Pl. 63 — **A—D.** *Ramsaysphaera ramses* Pflug 1976. Microfosile levuriforme, în vîrstă de ~ 3400 milioane de ani, izolate din chertul Swartkoppie, Africa de Sud (după Pflug, 1982). **E—I.** *Isuasphaera isua* Pflug 1978, izolată din cuarţitele din Isua—Greenland, în vîrstă de ~ 3800 milioane de ani: E, celulă cu cicatrice după înmugurire; F, celulă cu trei muguri; s — cicatricea unui mugure desprins. G—I, forme unicelulare sferice; fotografii după secţionare fină (E—G), sau după macerarea reziduurilor (H—I) (după Pflug, 1982).

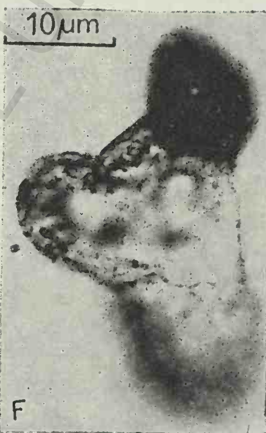

A

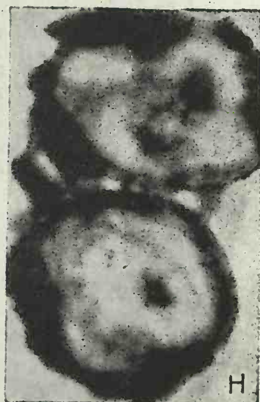

B

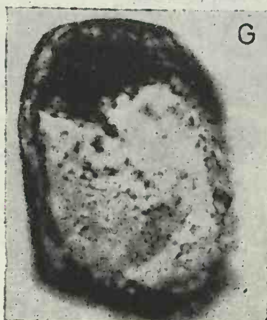

C


D
2 µm

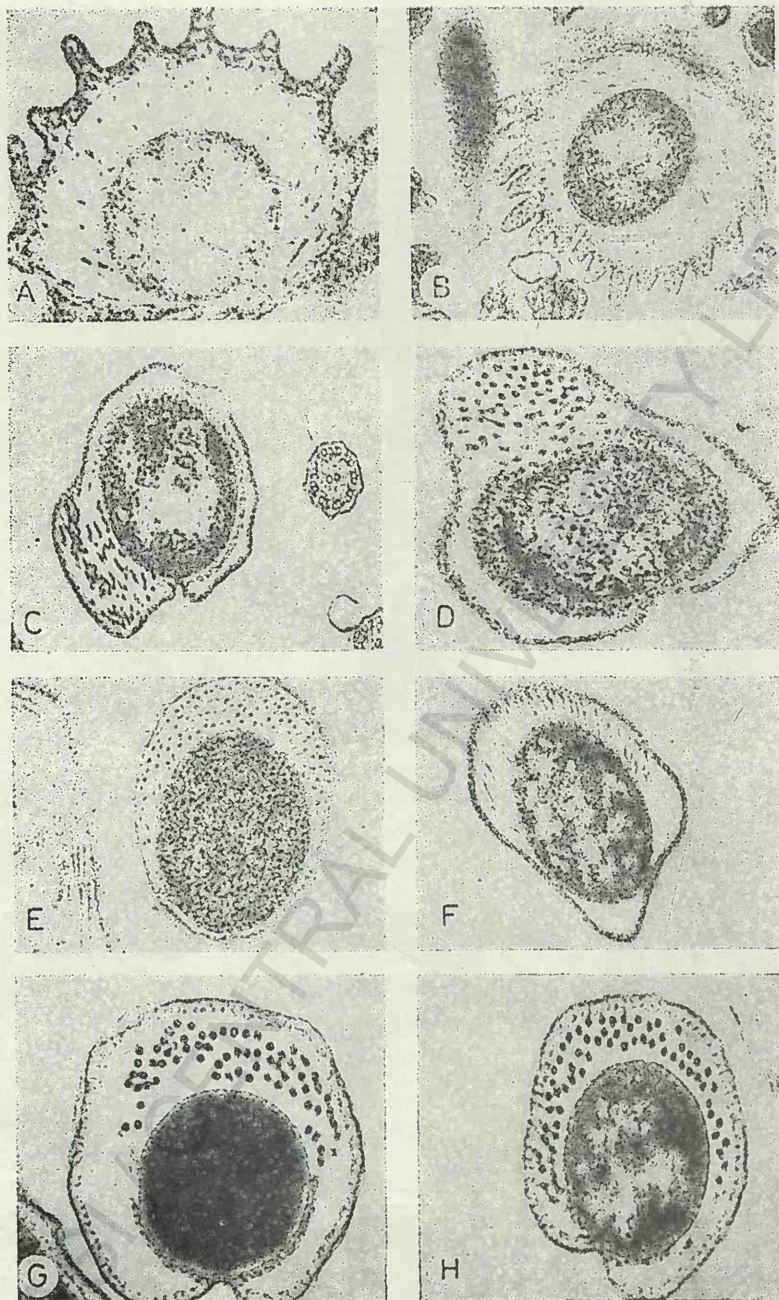

s
E
10 µm


10 µm
F


H


G


I



Pl. 64 – Microelectronografiile unor secțiuni ultrafine prin celulele unor spirochete din familia *Pillotina* (după Sagan-Margulis, 1982).

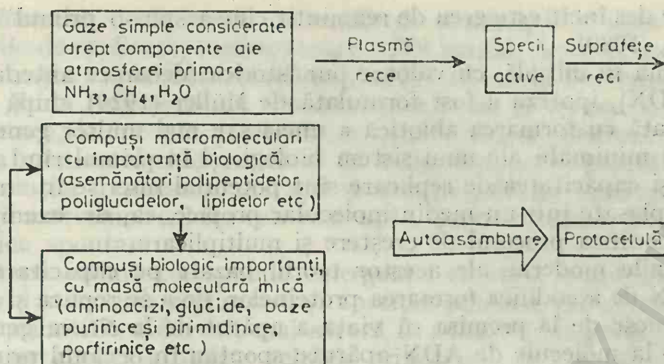


Fig. 233. — Modelul evoluției vieții, după „teoria la rece" (după Simionescu și Dénes, 1983).

IPOTEZA PANSPERMIEI DIRIJATE

Crick și Orgel (1973), ca și Crick (1983) consideră că viața ar fi apărut pe o altă planetă „mai veche", care a beneficiat de condiții asemănătoare sau chiar mai bune pentru apariția ei. Pămîntul și probabil alte planete sterile au fost „însămînțate" cu forme vii elementare, de tipul microorganismelor actuale, în mod deliberat de către unele ființe inteligente aparținînd unor civilizații avansate, trăind în sisteme solare a căror perioadă de evoluție a fost cu cîteva miliarde de ani anterioară celei a planetei noastre. Protejarea microorganismelor de acțiunea nocivă a mediului extraterestru, în special a radiațiilor cosmice, s-ar fi realizat în nave spațiale, mai perfecționate decît cele actuale.

În sprijinul acestei ipoteze, numită *panspermie dirijată* („directed panspermia"), Crick aduce în special două argumente: 1) dacă viața ar avea originea pe Pămînt, ar fi apărut în mod cert în mai multe locuri simultan; în acest caz ar fi greu de explicat caracterul uniform, cvasiuniversal, al codului genetic și absența unor mecanisme precursoare lui și 2) ținînd seama de ritmul general al evoluției, timpul scurs între formarea Pămîntului și apariția cianobacteriilor este mult prea scurt pentru a putea explica apariția lor.

APARIȚIA INFORMAȚIEI BIOLOGICE

Una dintre etapele esențiale ale evoluției biologice a fost aceea a apariției informației biologice. Nu există un acord unanim nici în această privință, unii cercetători pledînd pentru caracterul primordial al ADN, în timp ce alții acordă un rol esențial ARN sau chiar polipeptidelor prebiotice ca purtători ai informației protogenetice.

TEORII BAZATE PE CARACTERUL PRIMORDIAL AL ADN

Reunite de Barbieri (1981) sub denumirea de teorii ale genotipului, aceste concepții reprezintă proiecția evoluționară a ideii că organismele folosesc calea simplă a ADN pentru a produce mai mult ADN, „o idee expri-

mată atît de des încît este greu de reamintit cine a spus-o primul" (Doolittle şi Sapienza, 1980).

În forma sa iniţială, cu valoare pur istorică (deoarece antedatează descoperirea ADN), ipoteza a fost formulată de Müller (1929), după care viaţa a apărut odată cu formarea abiotică a uneia sau mai multor gene. După el, proprietăţile minimale ale unui sistem biologic şi în primul rînd activitatea metabolică şi capacitatea de replicare sînt potenţial înscrise în structura genelor, care, plasate într-un mediu molecular propice, ca, de exemplu, într-o celulă, pot codifica procesul de creştere şi multiplicare.

Versiunile moderne ale acestor teorii, bazate pe capacitatea moleculelor de ADN de a codifica formarea proteinelor, de a se replica şi de a suferi mutaţii, pornesc de la premisa că viaţa a apărut de la cîteva gene „nude", respectiv de la molecule de ADN apărute spontan în oceanul primitiv, care la un moment dat au început să se replice, producînd copii ale lor. Mecanismul de replicare a fost iniţial lipsit de acurateţe şi ocazional predispus la erori, fapt care a determinat un grad foarte important de eterogenitate în populaţia de molecule replicative, pe cale de creştere. Este probabil că în fazele iniţiale au acţionat şi unele enzime apărute spontan sau alţi catalizatori mai simpli. Dat fiind faptul că rezervele de nucleotide nu erau nelimitate, este de presupus că la un moment dat între moleculele replicative a început o competiţie pentru puţinele nucleotide disponibile. În cadrul acestei competiţii, unele molecule ar fi dobîndit capacitatea de a rupe moleculele „rivale" şi de a utiliza blocurile de construcţie eliberate pentru formarea unor copii proprii, iar altele ar fi „descoperit" mecanisme de a se proteja ele însele, fie pe cale chimică, fie pe cale fizică, prin construcţia unui înveliş protector de natură proteică. În felul acesta, ca urmare a acestui proces de „luptă pentru existenţă" la nivel molecular, ar fi apărut prima celulă (Dawkins, 1976).

Autorii acestei teorii invocă în sprijinul lor faptul că o serie de date experimentale permit supoziţia existenţei în trecut a unei forme primitive de viaţă, bazată pe nucleotide, în absenţa proteinelor. În acea perioadă, polinucleotidele — respectiv ADN primitiv — ar fi fost capabil să servească drept matriţă şi să se replice în absenţa enzimelor, formînd polinucleotide complementare cu ajutorul polifosfaţilor formaţi abiotic (posibil ca precursori ai ATP), al altor catalizatori abiotici sau al unor agenţi de condensare. Deşi se admite că fără proteine nu s-ar fi putut realiza un mare progres evolutiv, capacitatea polinucleotidelor de a suferi mutaţii sub acţiunea unor agenţi fizici (de exemplu, razele UV) ar fi permis ca o „viaţă" bazată exclusiv pe acizii nucleici să poată asigura un grad oarecare de evoluţie, în absenţa totală a proteinelor.

IPOTEZA LUI MONOD

J. Monod (1971) consideră că descoperirea mecanismelor universale pe care se bazează proprietăţile esenţiale ale fiinţelor vii are ca rezultat punerea problemei originii vieţii în termeni mult mai precişi şi face răspunsul mult mai dificil decît înainte. În teoria sa, formulată în termenii biologiei moleculare — ca o versiune a teoriilor genotipului — evoluţia precelulară a avut trei faze:

1) Formarea de nucleotide şi aminoacizi din constituenţi chimici esenţiali ai organismelor vii.

2) Formarea de la aceste materiale de construcție a unor macromolecule capabile de replicare, asemănătoare ADN actual. Acest proces este bazat pe demonstrația experimentală (Orgel, 1971) că unele secvențe polinucleotidice pot ghida împerecherea spontană a bazelor și formarea de secvențe complementare, la început printr-un mecanism foarte ineficace și predispus la erori. În momentul cînd au intrat în acțiune cele trei procese fundamentale ale evoluției (replicarea, mutația și selecția), ele au conferit un avantaj considerabil macromoleculelor cele mai apte, prin structura lor secvențială, să se replice spontan.

3) Etapa ultimă corespunde emergenței treptate a sistemelor teleonomice în jurul structurii replicative și apariția celulelor primitive. Pe măsură ce „supa" primitivă a devenit mai săracă în substanțe organice, dezvoltarea sistemelor metabolice a obligat celulele primitive „să învețe" să mobilizeze potențialul chimic și să sintetizeze noi constituenți celulari. Problema majoră rămîne, după Monod (1971), originea codului genetic*) și a mecanismelor de traducere a informației genetice.

ARN CA MOLECULĂ PRIMORDIALĂ, PURTĂTOARE DE INFORMAȚIE BIOLOGICĂ. TEORIA RIBOTIPULUI ASUPRA ORIGINII VIEȚII

Bazat pe rolul sistemului ribonucleoproteinelor celulare de intermediar între gene și proteine, Barbieri (1981) substituie conceptul tradițional privind dualitatea genotip—fenotip cu ideea că fiecare celulă sau organism este o trinitate „genotip—ribotip—fenotip", în care fiecare membru are o importanță egală cu a celorlalți doi. El consideră că viața a apărut pe pămînt odată cu strămoșii ribotipurilor actuale și propune o ipoteză privind originea și evoluția vieții, deosebită de alte ipoteze, în special prin natura etapelor de evoluție precelulară și protocelulară. Denumirea generică de *ribotip* trebuie atribuită, după Barbieri, sistemului ribonucleoproteic al fiecărei celule și are ca principal reprezentant ribosomii. În acord cu ipoteza sa, evoluția formelor de viață a urmat trei etape succesive: evoluția precelulară, evoluția protocelulară și evoluția celulară (fig. 234).

Evoluția precelulară a fost inițiată de apariția unor structuri chimice, denumite de Barbieri *ribozoizi*, alcătuite din ARN sau ribonucleoproteine, formate în perioada premergătoare a evoluției chimice într-o gamă mare de varietăți, datorită numărului mare de posibilități în care se pot asocia monomerii din structura polipeptidelor și polinucleotidelor.

Ribozoizii au avut funcția unor protoribosomi, utilizați ulterior și de protocelule pentru sinteza proteinelor, dar nu în sensul modern al conceptului (de „mașinărie de traducere" fidelă a informației genetice), deoarece codul genetic nu apăruse. Funcția lor esențială a fost aceea de activitate polimerizantă, datorită capacității de a „lipi" aminoacizii, cu o rată foarte ridicată, și de a produce pe această cale proteine cu o structură total întîmplătoare. Funcționarea lor cu acuratețe nici nu era necesară, deoarece moleculele de ARN mesager din oceanul primitiv erau, la rîndul lor, secvențe nucleotidice asamblate la întîmplare și, ca atare, polinucleotidele formate prin

*) Problema originii și evoluției codului genetic va fi tratată în volumul III.

utilizarea lor ca „template" (matriță) nu puteau avea decît o compoziție, de asemenea, aleatorie. Cu toate acestea, activitatea ribozoizilor a avut un rol important în faza evoluției precelulare, în primul rînd pentru transformarea „supei" primitive dintr-un sistem diluat de substanțe organice într-unul bogat, conținînd o largă gamă de polipeptide diferite. Ei au furnizat un mecanism de replicare macromoleculară, înainte de apariția primelor celule care se divid sau mai corect spus o formă de cvasireplicare, deoarece, în funcție

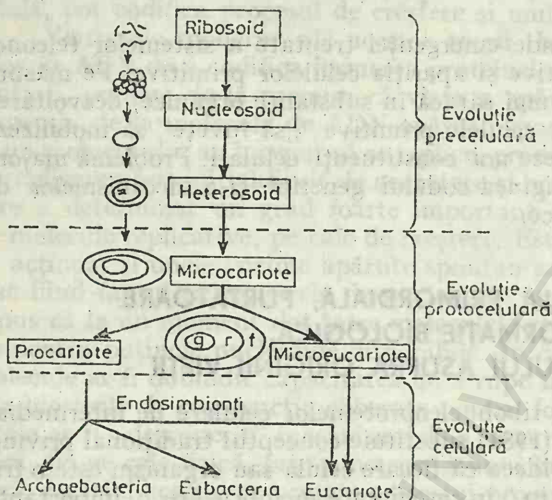


Fig. 234. — Evoluția formelor de viață după ipoteza ribotipului (după Barbieri, 1981).

de polimorfismul lor structural, ribozoizii produceau la întîmplare o gamă largă de produși. Dintre aceștia, unii se autoasamblau pentru a forma noi protoribosomi, cu aceeași funcție ca și precursorii lor, chiar dacă aveau altă compoziție chimică și altă structură.

Nucleozoizii. Cînd mediul primitiv s-a îmbogățit în polipeptide și ribonucleotide, o parte din acestea s-au asamblat pentru a forma o serie de agregate supramoleculare, denumite *nucleozoizi*, datorită limitelor lor de dimensiune, apreciate de Barbieri ca fiind apropiate de cele ale nucleolilor actuali.

Nucleozoizii, reprezentînd deci coacervate de ribozoizi sau de ribozoizi și alți compuși, erau structuri formate la întîmplare, foarte eterogene ca dimensiuni, formă și proprietăți. Unii erau inerți, comportîndu-se ca structuri nonsens, alții aveau anumite funcții biologice, comportîndu-se ca un sistem microcosmic de ribosomi și ARN capabil să asigure sinteza a diferiți compuși, deși nu încă foarte corect din punct de vedere evolutiv.

Heterozoizii. Evoluția nucleozoizilor a dus spre formarea unui sistem membranar și asocierea lor cu acesta. Prezența membranei a devenit un avantaj selectiv important, fapt care a asigurat creșterea proporției nucleozoizilor protejați de membrane, în cursul evoluției. Ulterior, aceste structuri au devenit și mai complexe, prin „contaminarea" lor cu molecule de ADN prezente în „supa" primitivă. Nucleozoizii avînd în structura lor ADN, care s-a substituit ARN, ca depozitar de informații, au devenit *nucleozoizi heterogeni* sau *heterozoizi*. Datorită caracterului mai stabil al ADN, ei au reprezentat un avantaj selectiv față de nucleozoizii propriu-ziși.

Evoluția protocelulară. Formele precelulare de viață au apărut, după Barbieri, din agregatele ribonucleoproteinice supramoleculare, capabile să producă descendenți prin cvasireplicare. Ele aveau forma unor mici saci, cu dimensiunea unor nuclei mici, și conțineau o zonă centrală („core") ribonucleoproteică, similară nucleolilor. În cursul evoluției protocelulare s-a produs o evoluție a ribosomilor, în sensul tranziției acestora de la greutăți moleculare mici spre greutăți moleculare mai mari. Această evoluție a fost determinată, pe de o parte, de selecția naturală a sistemelor cvasireplicative cu complexitate crescîndă și, pe de alta, de necesitatea unei mai mari acuratețe a traducerii informației genetice și de apariția specificității biologice. Este probabil că toate protocelulele au avut inițial ribosomi 80 S sau chiar mai grei. În momentul în care ele s-au format definitiv, unii ribosomi s-au stabilizat ca mărime, iar alții au evoluat regresiv spre ribosomi 70 S.

Protocelulele numite microcariote, care, după Barbieri, au fost precursorii eucariotelor actuale, deși nu întruneau toate caracteristicile acestora, și-au îmbunătățit prin mutație performanțele și s-au înmulțit, datorită avantajului selectiv reprezentat de structura lor. Final, unele dintre ele au devenit *procariote* și altele *microeucariote.*

Evoluția celulară. În concepția lui Barbieri, un rol esențial în diferențierea procariotelor și a eucariotelor l-a avut natura ribosomilor — 70 S și respectiv 80 S —, care nu ar reprezenta una dintre diferențele caracteristice, dobîndite de cele două tipuri de celule după divergența strămoșilor lor, ci o precondiție a acestei divergențe. Prezența unor ribosomi 70 S înseamnă, după Barbieri, evoluția obligatorie spre organizarea de tip procariot, respectiv spre imposibilitatea de izolare a genomului într-un compartiment subcelular de tipul nucleului, delimitat de o membrană nucleară. În cursul evoluției celulare, procariotele au format cele două grupuri de bază, *Archaebacteria* și *Eubacteria,* în timp ce microeucariotele, dezavantajate față de procariote din cauza competiției pentru sursele de energie, au compensat acest deficit, prin dobîndirea capacității de endocitoză, care a permis formarea organitelor (mitocondrii și cloroplaste prin stabilirea intracelulară a unor eubacterii simbionte (fig. 234).

ARGUMENTE ÎN FAVOAREA CARACTERULUI PRIMORDIAL AL ARN

Caracterul primordial al ARN ca purtător de informație biologică este susținut și de Eigen și colab. (1981), bazîndu-se nu numai pe posibilitatea obținerii în condiții abiotice experimentale a unor secvențe lineare de ribonucleotide, legate prin legături fosfodiester, ci și pe o serie de alte argumente, între care cităm următoarele: 1) sinteza monomerilor nucleotidici din structura ADN are loc și în celulele actuale pe calea unor intermediari cu riboză; 2) replicarea ADN este inițiată de prezența unui ARN „primer" (inițiator) și se realizează printr-un mecanism mai sofisticat decît replicarea ARN. Procesul include mecanisme subtile de detectare și corectare a erorilor și implică intrarea în acțiune a aproximativ 20 de enzime și 3) în organismele actuale, informația genetică este prelucrată de o „mașinărie" complexă, care

include în mod obligatoriu prezenţa ARN şi a numeroase proteine. Este de aşteptat că evoluţia acestei maşinării de sinteză a fost condiţionată de necesitatea ca purtătorii de informaţie înşişi să fi avut particularităţi structurale care să le permită să funcţioneze ca „ţinte" pentru recunoaştere. Or, după cum este ştiut, ARN monocatenar poate forma o mare varietate de structuri tridimensionale, în contrast cu uniformitatea structurală a ADN.

Eigen (1981, 1983) presupune că activitatea căilor primordiale de sinteză şi diferenţiere a dus la apariţia unor concentraţii mici de secvenţe scurte nucleotidice, conţinînd cîteva baze şi cîteva legături covalente şi o anumită aranjare spaţială a grupărilor chimice. Pe lîngă aceste molecule, care ar putea fi identificate cu tehnicile actuale drept „corecte", s-au format şi numeroase secvenţe „greşite", conţinînd baze anormale, legături covalente greşit plasate, stereochimii variabile. În cursul evoluţiei ulterioare, moleculele corecte cu stereochimie omogenă au devenit mai rezistente la hidroliză, ca urmare a formării unei structuri secundare stabile, prin plierea moleculelor, consecutiv formării de legături de H între bazele complementare. Cu timpul, moleculele de ARN corecte au devenit capabile de replicare stabilă, respectiv au dobîndit capacitatea de a acţiona simultan ca sursă de instrucţiuni pentru un anumit tip de împerecheri de baze şi ca molecule-ţintă, care trebuie sintetizate în acord cu instrucţiunile respective. Remarcînd faptul că în celulele actuale ARN este totdeauna prezent oriunde sînt necesare proprietăţile funcţionale esenţiale sau informaţionale, Eigen (1981, 1983) consideră, pe baza datelor actuale, că nu există motive să credem că în formele primitive de viaţă a fost altfel şi nici că informaţia a fost iniţial stocată în molecule de altă natură, de la care a trecut la acizii nucleici. În plus, descoperirea virusurilor cu genom ARN şi a transcriptazei inverse demonstrează că nu există nici o barieră conceptuală în acceptarea ARN ca prim tip de acid nucleic cu rol informaţional.

POLIPEPTIDELE PREBIOTICE ŞI ORIGINEA INFORMAŢIEI BIOLOGICE

Dose (1983) consideră că experienţele de simulare prebiotică şi interpretarea lor pledează pentru ipoteza caracterului primordial al protoproteinelor şi ca purtători ai informaţiei protogenetice necesară pentru evoluţia vieţii actuale. Sursa de informaţie ar decurge din reactivitatea chimică a aminoacizilor, abundenţa lor prebiotică şi mediul prebiotic. Recunoscînd necesitatea mai multor probe capabile să confirme ipoteza că poliaminoacizii sînt precursorii evolutivi direcţi ai proteinelor contemporane şi ai acizilor nucleici, el consideră, pe baza datelor disponibile în prezent, că „proteinoidele au fost primele macromolecule informaţionale pe scena protobiotică". Unul dintre argumente este acela că şi în prezent „autoreplicarea nucleotidelor" este condiţionată de intervenţia unor enzime. Or, şansa formării simultane a unor polinucleotide stereochimic corespunzătoare şi a unor replicaze specifice este extrem de redusă sau chiar nulă, după datele actuale. Presupunînd că replicarea ADN s-a făcut iniţial printr-o cataliză neenzimatică, suficient de specifică, rămîne neexplicat modul în care a apărut structura specifică a primului nucleotid replicabil.

Ipoteza caracterului informaţional al protoproteinelor este în dezacord cu „dogma centrală a biologiei moleculare”, care interzice traducerea inversă (proteine — acizi nucleici) în celulele contemporane. Această dogmă nu exclude însă posibilitatea proteinelor de a cataliza sinteza unor secvenţe nucleotidice specifice, în absenţa unui acid nucleic cu rol de primer, după cum s-a demonstrat cu replicaza fagului Qβ (Sumper şi Luce, 1975).

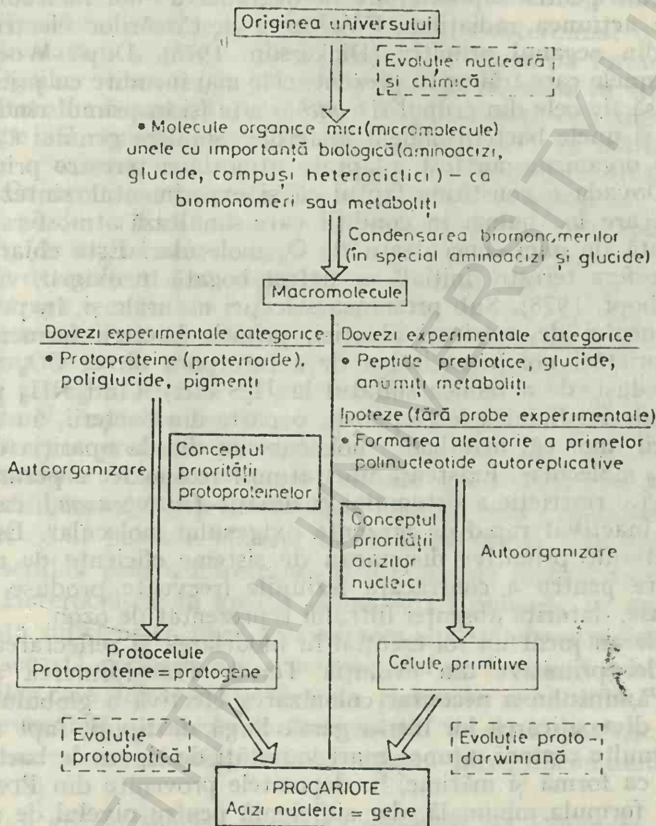


Fig. 235. — Schema evoluţiei procariotelor. După conceptul priorităţii proteinelor (stînga), primii biopolimeri informaţionali au fost proteinoidele. În cursul evoluţiei ulterioare, informaţia lor a fost tradusă în secvenţele specifice ale primilor acizi nucleici informaţionali. După conceptul priorităţii acizilor nucleici (dreapta), informaţia biologică a evoluat *ab initio* pornind de la polinucleotide formate spontan (după Dose, 1983).

Ipoteza lui Dose (fig. 235) este în acord cu ipoteza protohiperciclului (Matsuno, 1982), bazată pe activitatea combinată a peptid sintetazei şi a nucleotid polimerazei, care implică transferul sau traducerea informaţiei din polipeptide în polinucleotide. La rîndul său, ipoteza protohiperciclului este un precursor al ipotezei hiperciclului (Eigen, 1971), bazată pe traducerea secvenţei nucleotidelor în secvenţe de aminoacizi şi pe replicarea ADN, catalizată de enzime.

APARIȚIA PRIMELOR ORGANISME VII

Evoluția biologică a început acum 4×10^9 ani și continuă și în prezent. Natura primelor organisme vii este încă discutată. Este probabil că primele organisme vii au fost unicelulare, sferoidale, posesoare ale unui aparat genetic complet, cu o fiziologie asemănătoare celor din genul *Clostridium* actual, fiind dependente pentru supraviețuire de degradarea unor molecule organice rezultate din acțiunea radiațiilor UV sau a descărcărilor electrice asupra moleculelor din oceanul primitiv (Dickerson, 1978). După Woese (1981), dintre organismele care trăiesc în prezent, cele mai înrudite cu primele forme de viață par să fie cele din grupul *Archaebacteria* (și în primul rînd bacteriile metanogene) și unele bacterii obligat anaerobe, similare genului *Clostridium*.

Primele organisme au fost adaptate atmosferei terestre primitive, de tip anoxic. Dovada o constituie faptul că și experimental sinteza compușilor organici are loc numai în condiții care simulează atmosfera primitivă și este inhibată de mici concentrații de O_2 molecular. Este chiar probabil, că dacă atmosfera terestră inițială ar fi fost bogată în oxigen, viața nu ar fi apărut (Schopf, 1978). Sub presiunea selecției naturale și, în primul rînd, a sărăcirii stocului de nutrienți abiotici, primele bacterii fermentative au dobîndit proprietăți noi (capacitatea de a încorpora direct CO_2 atmosferic în compuși reduși, de a reduce sulfatul la H_2S etc.). Cînd NH_3 prezent în diferite zone ale mediului a fost epuizat, o parte din bacterii au evoluat în sensul formării unor căi metabolice noi, care au dus la apariția capacității de fixare a N_2 molecular. Existența unei atmosfere anoxice a permis funcționarea fără nici o restricție a sistemului enzimatic (*nitrogenaza*), care asigură acest proces, inactivat rapid de prezența oxigenului molecular. Este de presupus că bacteriile primitive dispuneau de sisteme eficiente de reparare a ADN, necesare pentru a contracara leziunile frecvente produse de radiațiile UV intense, datorită absenței filtrului reprezentat de ozon.

Bacteriile au jucat un rol esențial în modelarea și reflectarea parametrilor perioadei primitive din evoluția Terrei. Transformarea atmosferei primitive a Pămîntului a necesitat colonizarea efectivă a globului de către procariote și diversificarea lor într-o gamă largă de tipuri, fapt atestat de prezența, în multe regiuni, a unor mari varietăți de tipuri de bacterii fosilizate, diferite ca formă și mărime, în depozitele provenite din Precambrian. Reprezentînd formula minimală, dar suficientă pentru nivelul de organizare celulară, emergența celulei bacteriene a marcat un eveniment crucial în istoria vieții, deoarece a făcut posibilă replicarea, i-a îmbunătățit eficiența, a întemeiat viața și, prin aceasta, a amorsat procesul evoluției (Palade, 1967). De aceea, prima perioadă a evoluției celulare a fost descrisă ca „era procariotelor". După Woese (1977), înțelegerea filogeniei bacteriilor este esențială pentru orice încercare de a reconstitui scenariul primitiv al evoluției Precambrianului, care fără un asemenea fundal rămîne pur speculativ.

APARIȚIA FOTOSINTEZEI

Primele organisme fotosintetizante au fost bacterii anaerobe, capabile să utilizeze H_2S ca sursă de hidrogen pentru reducerea de CO_2, așa cum fac în prezent bacteriile sulfuroase verzi și roșii (fotosinteză anoxigenică). Această

etapă a precedat etapa a II-a — mai complicată — de fotosinteză oxigenică, legată de apariția cianobacteriilor („algele albastre-verzi"), capabile să utilizeze hidrogenul rezultat din descompunerea (fotoliza) apei. Cum apa era prezentă în cantitate foarte mare, organismele capabile să utilizeze H din apă, mai degrabă decît din H_2S, au avut un foarte mare avantaj evolutiv. Cercetările de paleomicrobiologie și cele de geochimie (bazate pe studiul mineralelor care au fost influențate de prezența O_2 liber în momentul depozitării lor)*) fixează data apariției cianobacteriilor acum 2,3 miliarde de ani.

Apariția fotosintezei producătoare de O_2 a determinat o transformare profundă în natura atmosferei Pămîntului și în evoluția formelor de viață. Prezența O_2 liber (o moleculă din cinci), apariția ozonului în straturile superioare ale atmosferei cu rolul său de reducere a cantității de radiații UV nocive incidente pe sol, apariția producătorilor primari etc. au mărit capacitatea planetei de a asigura viața și au permis inițierea unei noi faze în evoluția biologică. Ca urmare, unele organisme anaerobe probabil că au dispărut, în timp ce altele au fost forțate să se adapteze, fie retrăgîndu-se în medii lipsite de O_2 (de ex., nămoluri), unde trăiesc și astăzi, fie dezvoltînd mecanisme specifice de detoxifiere a metaboliților produși pe cale oxibiotică, cu avantajul de a extrage o cantitate mult mai mare de energie din substanțele nutritive. Unele microorganisme fixatoare de N_2 s-au adaptat la un habitat anaerob, în timp ce altele și-au format structuri sau mecanisme biochimice de protecție a nitrogenazei față de inactivarea prin efectul O_2. Cianobacteriile fixatoare de N_2 însile au format celule specializate pentru fixarea N_2 (heterochiști), în care protecția sistemului nitrogenazic este asigurată prin mai multe mecanisme complexe (perete celular gros, strat mucilaginos care împiedică difuziunea O_2, prezența unor enzime care „consumă" repede O_2 necombinat ce ar putea fi eliberat în interiorul lor și, mai ales, lipsa unor pigmenți esențiali pentru fotosinteză și din aceasta incapacitatea de a produce O_2). Heterochiștii au apărut acum $\sim$ 2,2 miliarde de ani, dovadă că atunci exista suficient O_2 liber. Dezvoltarea și răspîndirea rapidă a cianobacteriilor în această perioadă a precambrianului au favorizat apariția și evoluția bacteriilor care folosesc O_2 liber în procesele metabolice, precum și o tendință ireversibilă spre acumularea crescîndă de O_2 atmosferic, care a asigurat dominarea organismelor aerobe asupra întregii comunități biologice (Schopf, 1978).

Cînd au apărut celulele eucariote, oxigenul era abundent, azotul fixat (NH_3, NO_3^-) era mai puțin rar, astfel încît organismele eucariote nu au mai păstrat capacitatea de a fixa N_2 molecular, care a rămas pînă astăzi o proprietate exclusivă a procariotelor. Primele celule eucariote au apărut acum 1 500—1 400 milioane de ani, cînd prevala o atmosferă stabilă, bogată în O_2. Ca urmare, toate organismele eucariote au fost de la început puternic aerobe și nu au mai dezvoltat mecanismele de adaptare la fluctuații ale nivelului de O_2, ca în cazul organismelor primitive. Marea diversitate a tipurilor de celule eucariote prezentă începînd de acum $\sim$ 1 miliard de ani sugerează

*) Depozitele de uraninită (UO_2) — spre exemplu — s-au format în perioada anoxică a Precambrianului. În prezența O_2, granulele de UO_2 au fost oxidate ușor la U_3O_8 și dizolvate. De aceea, uraninita nu s-a mai putut acumula cînd concentrația O_2 a depășit 1% (Schopf, 1978).

apariția proceselor de reproducere sexuată în această perioadă. Aceste procese au asigurat în următorii ~ 400 milioane de ani diversificarea rapidă a organismelor eucariote, ducînd la emergența formelor multicelulare de viață, strămoșii plantelor și animalelor actuale (fig. 236).

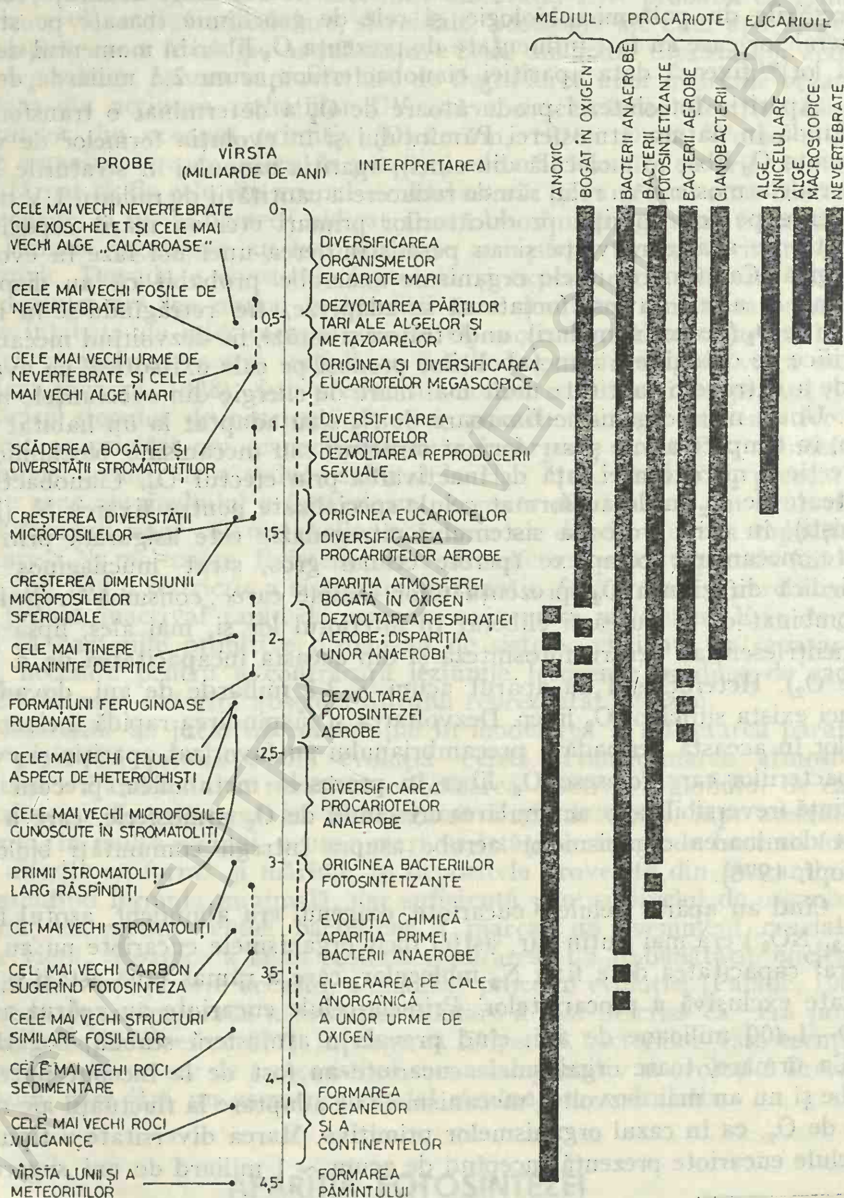


Fig. 236. — Evenimentele majore din Precambrian prezentate în ordine cronologică, pe baza datelor furnizate de prezența fosilelor, a geologiei anorganice și a studiilor de biochimie comparată a organismelor moderne (după Schopf, 1978).

ARGUMENTE PRIVIND CARACTERUL PRIMORDIAL AL CELULELOR PROCARIOTE

Deşi diferenţele dintre celulele procariote şi cele eucariote sînt foarte mari şi probele de omologie sînt evidente numai la nivel molecular (cod genetic comun, mecanisme similare de replicare şi circulaţie a informaţiei genetice, de biosinteză a principalelor categorii de constituenţi celulari etc.), originea lor complet separată este improbabilă. Legătura dintre proprietăţile lor comune este suficient de complexă pentru a sugera originea lor, dintr-un strămoş comun „celular" (Stanier, 1970).

În afară de evidenţele furnizate de prezenţa microfosilelor de tip procariot în strate şi formaţiuni geologice, cu vîrste care depăşesc cu peste 2 miliarde de ani vîrsta fosilelor eucariote, şi alte particularităţi esenţiale pledează pentru caracterul primordial al procariotelor. Astfel, fotosinteza bacteriană are mecanisme mai simple şi necesită prezenţa unui singur tip de centru de reacţie, dovedind că mecanismele şi „maşinăria" de fotosinteză au evoluat în celulele procariote, pentru ca, ulterior, versiunea lor finală, reprezentată de cianobacterii, să fie implantată prin endosimbioză în celula eucariotă care are doi centri de reacţie fotochimică. Un alt argument este reprezentat de faptul că şi în prezent diferitele tipuri de celule procariote reţin cele mai multe vestigii biochimice şi fiziologice ale fazei anaerobe de evoluţie. Or, probele geochimice demonstrează neîndoielnic că iniţial Pămîntul a avut o atmosferă anaerobă, care a devenit aerobă ca rezultat al fotosintezei producătoare de O_2. Deci, primele forme de viaţă au fost dependente de un metabolism anaerob, care este întîlnit şi astăzi la bacterii în forme variate, inclusiv în acela de metabolism anaerob obligat. Tipul de metabolism anaerob este foarte rar la eucariote, fiind limitat la cîteva tipuri de protozoare şi la un singur reprezentant al regnului *Fungi*, ceea ce demonstrează că la acest tip de celule el reprezintă rezultatul unei adaptări relativ recente la nişe ecologice foarte specializate (Stanier, 1970). De asemenea, este de remarcat că multe particularităţi biochimice, foarte larg răspîndite sau universale la procariote, sînt total absente la eucariote.

În concluzie, se poate afirma că era Precambriană a fost o eră a organismelor microscopice procariote, în care influenţa vieţii asupra mediului a fost cel puţin tot atît de importantă ca şi influenţa mediului asupra vieţii (Schopf, 1978). Procesele evolutive au avut un caracter lent şi limitat, datorită lipsei reproducerii sexuate şi au fost mai curînd rezultatul inovaţiilor biochimice şi metabolice decît al celor morfologice. În cursul ei, atmosfera iniţial redusă şi anoxică a devenit oxidativă datorită activităţii cianobacteriilor. Era Phanerozoică (gr. = era vieţii manifeste) reprezintă era dezvoltării şi a dominaţiei eucariotelor, ca rezultat al metabolismului aerob şi al apariţiei sistemelor genetice.

MICROFOSILELE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR BIOLOGICĂ

Iniţial s-a considerat că microfosilele lipsesc complet din Precambrian şi că organismele prezente în Cambrian ar fi apărut brusc şi fără predecesori cunoscuţi. Cercetările efectuate în ultimele două decenii au infirmat

acest punct de vedere, demonstrînd prezența în 18 formațiuni geologice a numeroase microfosile, care probează că în cea mai mare parte a Preacambrianului (care reprezintă 7/8 din întreaga istorie a Pămîntului), singurii locuitori ai acestuia au fost o serie de microorganisme simple, comparabile ca mărime și complexitate cu bacteriile actuale. Microfosilele de acest tip au fost găsite în roci sedimentare de toate vîrstele, începînd cu cele foarte vechi, datînd de ~ 3,5 miliarde de ani (fig. 237).

Microfosilele, sub denumirea de *Archaeosphaeroides babertonensis* (Pflug, 1967), apar sub forma unor „sferoizi" cu diametrul de ~ 20 μm, asemănătoare cianobacteriilor actuale, în formațiunea Fig Tree, din regiunea Swaziland (Africa de Sud), avînd o vechime de ~ 3,4 miliarde de ani. În aceeași regiune, Barghoorn și Schopf (1966) au descris, sub denumirea de *Eobacterium isolatum*, microfosile cu formă cilindrică, incluse în strate avînd o vechime de ~ 3,2 miliarde de ani. Ulterior, Boureau (1970) a descris sub denumirea de *Nostocites vesiculosa* celule sferoidale cu ∅ de ~ 40—60 μm, similare cu cianobacteria *Nostoc* contemporană, incluse în formațiuni considerate ca un strat de mucus mai mult sau mai puțin gelificat.

Frecvent, sferoizii suferă un proces de mineralizare care le maschează structura și aspectul de foste organisme vii, transformîndu-se în ooliți. Aceștia apar sub forma unor globule minuscule, care se grupează prin juxtapoziție în anumite roci sedimentare. În acest caz nu se mai poate stabili dacă microfosilele sînt mărturii ale unui fenomen pur fizicochimic de mineralizare sau dacă sînt structuri biologice mineralizate *in vivo*. În sfîrșit, bacteria *Metallogenium personatum*, care oxidează Fe și Mn (prezentă și astăzi în unele lacuri din Carelia), a trăit acum ~ 2,8 miliarde de ani în Rhodezia și a fost regăsită în roci vechi de ~ 1 miliard de ani în formațiunea Richât din Mauritania.

Deși cei mai mulți cercetători consideră microfosilele descrise ca fiind de natură bacteriană, unii specialiști (Cloud, 1978; Fox, 1980), bazîndu-se pe uniformitatea structurii lor, le consideră ca microsfere proteinoide fosilizate.

În ultimii ani, o atenție deosebită a fost acordată microfosilelor asemănătoare bacteriilor și cianobacteriilor actuale, prezente în rocile precambriene vechi de ~ 1,9 miliarde de ani, numite *stromatoliți* (gr. stroma = strat, așternut; lithos = piatră), găsiți în formațiunea Gunflint Iron (Ontario — Canada). Avînd dimensiuni cuprinse între 1 cm și 1 m, stromatoliții descoperiți de Walcott (1899) sînt formați din mai multe straturi subțiri suprapuse, de lamele organice și calcare. Bacteriile incluse în structura lor (*Eoastrion simplex, E. bifurcatum*) se găsesc sub forma unor fosile bine păstrate, cu formă tridimensională și pereții celulari pietrificați (Barghoorn și Tyller, 1965).

Natura biologică a stromatoliților este demonstrată de prezența unora în curs de formare și astăzi, în regiunea Sharkbay (Australia). Cauza formării lor este reprezentată de precipitarea carbonatului de calciu și legarea sedimentelor de către populații de cianobacterii, ca rezultat al activității lor metabolice sau „capturarea" granulațiilor sedimentare în stratul gelatinos pericelular (Monty, 1967). Procesul se realizează numai în condițiile unui mediu hipersalin, care nu permite dezvoltarea nevertebratelor capabile să împiedice procesul de sedimentare (în precambrian stromatoliții s-au format după apariția microorganismelor fotosintetizante și înaintea nevertebratelor) (Schopf, 1977).

Creșterea stromatoliților este accelerată cînd lumina necesară pentru fotosinteză este mai intensă, astfel încît coloniile de microorganisme au tendința să determine formarea unor grămezi de straturi suprapuse. Faptul că stromatoliții fosilizați recent sînt foarte asemănători celor vechi a dus la

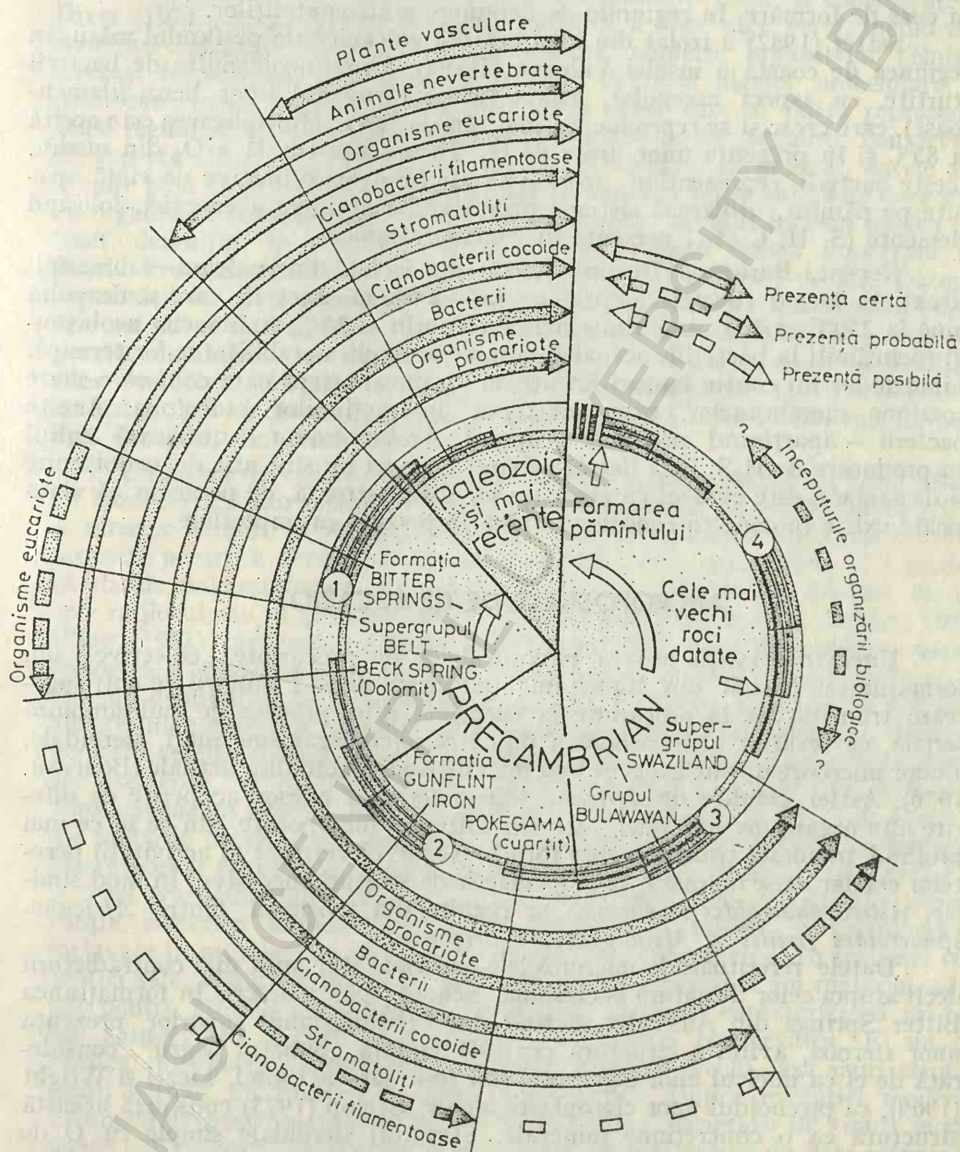


Fig. 237. — Schema unui ,,ceas geologic", în miliarde de ani, marcînd prezența principalelor formațiuni geologice studiate și tipurile de microfosile și fosile. Cifrele 1—4 indică vechimea în miliarde de ani (după Schopf, 1978).

concluzia că cel puţin o parte din microfosilele din formaţiunea Gunflint Iron au o origine similară. După unii cercetători, microfosilele bacteriene nu sînt structuri capabile să furnizeze informaţii deosebite, deoarece din simplele amprente ale unor microsfere sau „bacili" se pot deduce puţine date semnificative. De aceea se poate afirma că informaţiile cele mai importante au fost obţinute nu din examinarea lor, ci mai ales indirect, din studiul microfosilelor în curs de formare, în regiunile de depunere a stromatoliţilor.

Setter (1982) a izolat din mici cratere vulcanice de pe fundul mării, în regiunea de coastă a insulei Vulcano (Italia), forme neobişnuite de bacterii (turtite, cu aspect neregulat, legate prin intermediul unor benzi filamentoase), care cresc şi se reproduc cel mai bine la 105°C. Multiplicarea este oprită la 85°C şi în prezenţa unor urme de O_2. În absenţa totală a O_2 din mediu, aceste bacterii, reprezentînd „fosile vii" ale formelor primitive de viaţă apărute pe pămînt, utilizează sisteme primitive de obţinere a energiei, folosind elemente (S, H, C etc.) prezente în gazele vulcanice.

Recent, Baross şi Deming (1983) au izolat din vulcani submarini, situaţi în largul coastei californiene la — 2 600 m, bacterii care se dezvoltă bine la 250°C şi 265 atm. Proteinele lor conţin ~ 25% aminoacizi neobişnuiţi (neîntîlniţi la bacteriile actuale), ceea ce ar explica stabilitatea lor termică. Lipidele lor nu conţin lanţuri lineare, ci ramificate, fapt care conferă o mare coeziune membranelor, prin creşterea interacţiunilor hidrofobe. Aceste bacterii — aparţinînd probabil grupului *Archaebacteria* — utilizează sulful cu producere de H_2S. Deşi datele privind biologia lor sînt atît de neobişnuite şi de sumare, este evident că prezenţa lor demonstrează, de pe acum, că viaţa poate exista în condiţii considerate pînă în prezent ca imposibile.

MICROFOSILELE DE TIP EUCARIOT

Unele observaţii asupra microfosilelor de procariote „colective" din formaţiunea Richât din Mauritania (cu vîrsta de ~ 1 miliard de ani) sugerează tranziţia de la procariote la eucariote prin procese de endosimbioză serială, ca rezultat al încorporării de către microorganisme mari, sferoidale, a unor microorganisme exogene mai mici de tipul bacteriilor actuale (Boureau, 1976). Astfel, celulele de *Africanosphaeroides* apar adesea acoperite de diferite alte organisme mai mici, care sînt ulterior încorporate din ce în ce mai profund, în cursul tranziţiei spre forma *Osagia*, ca rezultat al activităţii peretelui celular ce se îngroaşă, prin formarea de straturi succesive. În mod similar, *Asterosphaeroides richatensis* ar rezulta din asocierea dintre *Africanosphaeroides fertilis* şi *Metallogenium personatum*.

Datele referitoare la microfosilele eucariote sînt mult mai contradictorii decît asupra celor de natură bacteriană. Schopf (1969) a descris în formaţiunea Bitter Springs din Australia, datînd din Precambrianul superior, prezenţa unor sferoizi, avînd o structură centrală numită „punctul negru", considerată de el ca nucleul unor alge verzi sau roşii, iar de Cloud, Licari şi Wright (1969), ca pirenoidul unor cloroplaste algale. Kremp (1973) consideră această structură ca o concreţiune minerală. Structuri sferoidale simple cu Ø de 40—420 µm au fost descrise, de asemenea, în Precambrianul superior, în formaţiunea Richât din Mauritania, sub denumirea de *Africanosphaeroides fertilis*, la care „punctul negru" a fost considerat ca un por situat la nivelul

peretelui, frecvent într-o mică depresiune, prin care sferoidul emite o substanţă. Din aceasta se diferenţiază ulterior, alţi sferoizi, mai mult sau mai puţin numeroşi. În sfîrşit, Schopf (1972) descrie în formaţiunea Bitter Springs din Australia, datînd de ~ 1 miliard de ani, prezenţa celulelor eucariote (contestată de unii cercetători), sub forma unor sferoizi, asemănători sporilor, dispuşi în tetrade sub denumirea de *Eotetrahedron princeps*. Microfosile similare descrise în formaţiunea Bungle-Bungle din Australia de nord, şi considerate de Diver (1974) ca procese de diviziune mitotică a unor alge verzi, includ mici structuri interne, delimitate de membrane, similare organitelor celulare. Aceeaşi formaţiune conţine şi microfosile de tipul algelor unicelulare, cu membrane intracitoplasmatice şi mici corpi denşi, care ar putea reprezenta, după regularitatea de formă, mărime şi distribuţie, fie organite conservate, fie aspecte ale nucleului în cursul diviziunii celulare. În general, datele acumulate pînă în prezent permit concluzia că apariţia primelor celule eucariote, cu organizare complexă, avînd materialul genetic agregat într-un nucleu distinct, delimitat de o membrană, reprezintă ultimul episod important din istoria Precambrianului şi a avut loc acum ~ 1,5 miliarde de ani. Datorită capacităţii lor de reproducere sexuată, variaţiile genetice ale celulelor parentale au putut fi transmise uşor la descendenţi, în combinaţii noi, ceea ce a permis răspîndirea lor rapidă în populaţie şi accelerarea ritmului modificărilor evolutive. Formele de viaţă superioare, complexe, multicelulare care au apărut şi s-au diversificat rapid după începutul Cambrianului sînt formate, fără excepţie, din celule eucariote.

Un punct de vedere complet diferit este exprimat recent de Pflug (1982), pe baza cercetărilor efectuate iniţial în colaborare cu Jaeschke-Boyer (1979) şi ulterior singur, în formaţiunea Isua din Groenlanda. Stabilind criteriile necesare pentru a determina natura biologică a unor microfosile, el consideră că datele paleontologice contrazic ideea că eucariotele au evoluat tardiv, spre mijlocul sau în perioada proterozoică tardivă (Schopf şi Dehler, 1976). Pflug (1982) pledează pe baza unor investigaţii moderne, pentru natura biologică a microfosilelor descrise în formaţiuni vechi de ~ 3,8 miliarde de ani sub denumirea de *Isuasphaera isua*, avînd aspectul unor celule individualizate, filamente sau colonii de celule, care prin formă, dimensiuni, structura peretelui celular, modul de creştere şi reproducere seamănă cu levurile moderne. De asemenea, el pledează pentru natura fungică a microfosilelor numite *Ramsaysphaera ramses*, prezente în formaţiuni din Africa de Sud, vechi de 3,4 miliarde de ani, care apar sub forma unor hife segmentate, ce formează blastospori şi ramificaţii laterale, aranjate în tetrade, ce se intersectează („în X") cu verticilii laxe, ramificate sau ca grămezi sferice. Coloniile gigante conţin structuri monocelulare, care înmuguresc, micelii şi pseudomicelii inclavate în mucilagii şi înconjurate de pelicule concentrice. În sprijinul concepţiei sale, Pflug consideră că stromatoliţii nu reprezintă un material adecvat pentru studiul evenimentelor evolutive, deoarece caracterizează un biotop conservator, locuit de organisme cu caracter conservator. Ei nu pot furniza informaţii reprezentative asupra evoluţiei vechi, aşa cum stromatoliţii actuali nu furnizează date semnificative asupra evoluţiei moderne. Sedimentele nestromatolitice conţin o mai mare varietate de tipuri morfologice şi furnizează un spectru mai complex şi mai variat de date referitoare la prezenţa altor taxoni în *Archean* alături de bacterii. Pflug (1982) consideră că diversificarea formelor de viaţă în principalele filumuri cunoscute

a avut loc înainte de 3,8 miliarde de ani şi, ca urmare, evoluţia nu a putut urma calea convenţională (protobiont → procariote → eucariote), acceptată în prezent de un număr important de specialişti. Totuşi, ţinînd seama de momentul formării planetei (~ 4,5 miliarde de ani) şi de acela al apariţiei primilor compuşi organici, este puţin probabil că a existat timpul necesar pentru apariţia unui organism atît de complicat cum sînt levurile într-o perioadă atît de scurtă de timp. Deşi seamănă cu levurile actuale, este probabil că *Isuasphaera isua* antedatează cu mult apariţia primelor celule eucariote în cursul evoluţiei.

APARIŢIA CELULELOR EUCARIOTE

Acumularea în atmosferă a O_2 produs de cianobacterii a determinat trecerea de la atmosfera reducătoare a Precambrianului inferior la o atmosferă oxidativă, care a determinat o schimbare majoră în particularităţile mediului global şi a influenţat întreaga evoluţie ulterioară a vieţii pe pămînt. Probabil că sub impulsul „crizei aerobe" care ameninţa existenţa anaerobilor obligaţi, unele bacterii anaerobe „au învăţat" cum să utilizeze O_2 sau au dezvoltat mecanisme specifice de detoxifiere a metaboliţilor produşi pe cale oxibiotică, în timp ce altele s-au retras în anumite nişe anaerobe, dînd naştere anaerobilor întîlniţi şi astăzi. În acelaşi timp, unele celule mari, anaerobe, amoeboide, au evoluat devenind strămoşii celulelor eucariote. Apariţia primelor celule eucariote, avînd ca principal factor stimulator „criza aerobă", s-a realizat acum ~ 1,5 miliarde de ani.

IPOTEZELE ENDOSIMBIOTICE

Una dintre caracteristicile definitorii ale celulelor eucariote este reprezentată de existenţa unui genom dispers (Stanier, 1970), sub forma unor genomuri fizic şi funcţional distincte, localizate în nucleu şi mitocondrii (ADN mit.), la celulele fotosintetizante adăugîndu-se un al treilea tip de ADN localizat în cloroplaste (ADN chl.).

După Gray şi Doolittle (1982), prezenţa organitelor (mitocondrii şi cloroplaste) şi a moleculelor de ADN care le caracterizează poate fi explicată prin două categorii de ipoteze: ipotezele endosimbiozei şi cele ale evoluţiei continue. *Ipotezele endosimbiotice* sau ale *xenogenezei* consideră că genomul nuclear şi cel al organitelor au fost anterior formării celulelor eucariote adăpostite în celule diferite, în care au avut o perioadă îndelungată de evoluţie independentă. Ele s-au reunit şi au stabilit relaţii simbiotice (probabil endosimbiotice) atunci cînd o celulă care conţinea genomul protonuclear a servit ca gazdă pentru celelalte. Ulterior, au apărut modificări în structura genomurilor respective şi schimburi de informaţie intergenomice, care au determinat, pe de o parte, diminuarea mărimii genomului organitelor şi pe de altă parte, mărirea corespunzătoare a genomului nuclear, prin adăugarea unor gene purtate anterior de genomul protoorganitelor. Aceste modificări s-au putut petrece independent pentru mitocondrii şi pentru plastide sau corelat pentru ambele.

Ipoteza simbiozei seriale

Ipoteza simbiozei seriale consideră că organitele intracelulare eucariote nu au luat naştere prin procese evolutive treptate şi continui, ci relativ brusc prin procese de endosimbioză, produse în etape succesive.

Ipoteza originii endosimbiotice a mitocondriilor a fost formulată de Altmann (1850), iar aceea a cloroplastelor de Mereschowsky (1905), Famizin (1907) şi Ris (1962). Ideea a fost reactualizată de Lynn Sagan-Margulis (1967), sub denumirea de *ipoteza simbiozei seriale* (fig. 238), în acord cu care

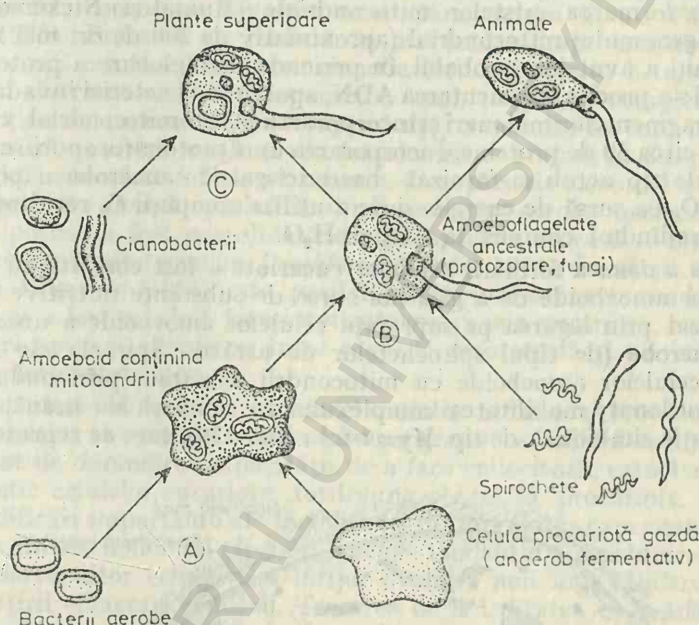


Fig. 238. — Schema celor trei faze ale ipotezei simbiozei seriale. **A.** Unirea unei bacterii mari, probabil anaerobă fermentativă, cu o bacterie aerobă apărută recent determină apariţia unor protiste amoeboide, ai căror simbionţi vor deveni mitocondrii. **B.** A doua simbioză ereditară reuneşte amoeboidul cu o spirochetă pentru a forma un amoeboflagelat ancestral, precursorul regnurilor *Fungi* şi *Animalia*. **C.** Endosimbioza unor cianobacterii în amoeboflagelat duce la apariţia plastidelor şi respectiv a regnului *Plantae* (după Margulis, 1971).

mitocondriile, cloroplastele, cilii şi flagelii de tip eucariot, ca şi microtubulii au luat naştere din organisme procariote, anterior autonome, care au stabilit o simbioză ereditară cu un alt procariot-gazdă.

Prima etapă în formarea celulei eucariote a corespuns apariţiei protomitocondriilor şi s-a realizat în momentul în care o bacterie-gazdă heterotrofă, facultativ anaerobă, a înglobat o bacterie Gram-negativă aerobă, posesoare a ciclului Krebs, similară cu bacteriile de tip *Paracoccus* sau *Micrococcus denitrificans* de astăzi. Încorporarea s-a făcut prin fagocitoză sau printr-un proces de invadare (cum este întîlnit azi la bacteria *Bdellovibrio*

şi gazdele sale) şi a fost urmată de o stabilizare a relaţiei dintre parazit şi gazdă, însoţită de modificarea gazdei simbiontului spre stadiul de celulă amoeboidă, din care au derivat toate eucariotele (Hall, 1973), şi de pierderea unei părţi din gradul de autonomie al simbionţilor intracelulari, care au evoluat spre stadiul de mitocondrii. În cursul evoluţiei lor intracelulare, protomitocondriile au pierdut componenţii de tipul peretelui celular, deveniţi inutili, iar în locul lor au fost acoperite de structuri membranare derivate din reticulul endoplasmatic, pentru a fi protejate de contactul direct cu citoplasma. Formarea membranei de înveliş a protomitocondriilor s-a făcut cu preţul unei compresiuni fizice, care a dus la apariţia unor invaginări tridimensionale şi la formarea cristelor mitocondriale (Munjal şi Nickerson, 1973). Reducerea genomului mitocondrial (aproximativ de 200 de ori mai mic decît cel bacterian) a avut loc, probabil, în perioada de înglobare a protomitocondriilor, cînd s-a produs fragmentarea ADN, aparţinînd bacteriei invadatoare, cu pierderea fragmentelor mai mari şi încorporarea ADN mitocondrial, care codifică numai circa 30 de proteine. Încorporarea unei protomitocondrii cu aparat respirator de tip aerob a furnizat bacteriei-gazdă anaerobe o posibilitate de a folosi O_2 ca sursă de energie şi de a utiliza compuşii C_3 rezultaţi din glicoliză, degradîndu-i complet la CO_2 şi H_2O.

Etapa a doua a formării celulelor eucariote a fost corelată cu necesitatea celulelor amoeboide de a găsi noi surse de substanţe nutritive în mediu şi s-a realizat prin legarea pe suprafaţa celulelor amoeboide a unor bacterii mobile anaerobe (de tipul spirochetelor de astăzi). Spirochetele fixate pe suprafaţa celulelor amoeboide cu mitocondrii asigurau, prin ondularea lor în mod coordonat, mobilitatea complexului în căutarea de hrană. A rezultat o asociaţie simbiotică de tip *Myxotricha* (fig. 239), care ar reprezenta stră-

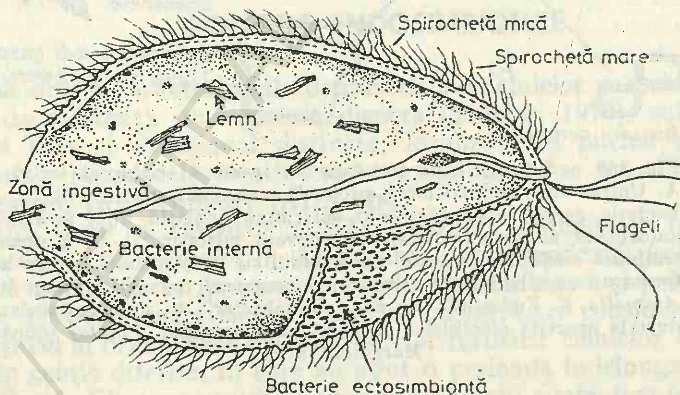


Fig. 239. — Reprezentarea schematică a protozoarului *Myxotricha paradoxa* şi a localizării celor trei tipuri de bacterii simbionte (după Margulis, 1971).

moşul universal al tuturor organismelor eucariote de astăzi. Odată cu apariţia acestei celule, „oaspeţii" interni au devenit mitocondrii, iar cei externi flageli: regnul *Monera* a dat naştere regnului *Protista*. Paralel, corpul bazal şi microtubulii au căpătat funcţii adiţionale în medierea procesului de diviziune celulară. S-au format centriolii şi fusul mitotic. Perfecţionarea mitozei

a durat ~ 1 miliard de ani, dar ea a fost „cheia viitorului" (Margulis, 1976), pentru că fără mitoză nu ar fi fost posibilă meioza, tipul de diviziune celulară care a permis apariţia ovulului şi a spermatozoidului. Fără mitoză nu ar fi fost posibilă apariţia organismelor complexe multicelulare şi nici selecţia naturală asupra lor. Cînd mitoza a fost perfectată, regnul *Protista* a dat naştere celorlalte trei regnuri (fungi, plante şi animale).

A treia etapă a simbiozei seriale reprezintă apariţia eucariotelor fotosintetizante, ca urmare a faptului că unele populaţii de protiste heterotrofe eucariote (mari, aerobe, cu mitocondrii în citoplasmă) au suferit un alt proces endosimbiotic, consecutiv ingestiei unor cianobacterii libere (Zablen, 1975; Bonen, 1975). Procesul s-a realizat în mai multe etape succesive, pornind de la asociaţii celulare laxe între cianobacterii şi bacteria heterotrofă-gazdă la stadiul de cianobacterii ectoparazite, apoi, parţial şi complet endoparazite, însoţite de procese de interdependenţă crescîndă, în care celula-gazdă beneficiază de produşii rezultaţi din fotosinteză, evoluînd, în ultimă instanţă, spre o celulă eucariotă fotosintetizatoare. Cloroplastele clorofilelor şi ale plantelor superioare derivă, probabil, din procariote aerobe necianobacteriene. Această ipoteză a fost consolidată de descoperirea recentă a acestui tip de procariote aparţinînd genului *Prochloron* (Lewin, 1981). În sfîrşit, după Gibbs (1981) şi Whatley (1981) este posibil că, în multe cazuri endosimbiontul originar nu a fost o celulă fotosintetizatoare, ci una eucariotă, ea însăşi produsul unei asocieri anterioare între o gazdă nefototrofă şi un endosimbiont procariot fotosintetizator.

Susţinător al ipotezei simbiozei seriale, Stanier (1970) consideră că impulsul iniţial al evoluţiei structurale progresive a celulei eucariote a fost determinat de dobîndirea capacităţii de a face endocitoză, caracter diferenţial caracteristic celulelor eucariote, totdeauna absent la procariote. Rezultat al unor modificări importante ale membranei de suprafaţă, capacitatea de endocitoză a conferit noilor săi posesori o nouă modalitate de obţinere a hranei, prin prădarea altor celule, şi a dirijat evoluţia noii linii celulare, în sensul îmbunătăţirii eficienţei prădării. Trecerea de la calitatea de prădător la prădător combinat cu/sau înlocuit de endosimbioză s-a realizat, probabil, în mai multe linii diferite de celule eucariote, de-a lungul unei îndelungate perioade evolutive. Spre deosebire de Margulis, Stanier bazat pe date geochimice, consideră că respiraţia aerobă a apărut pe pămînt probabil mult timp după emergenţa evolutivă a fotosintezei producătoare de O_2 şi că, probabil, mitocondriile sînt ultimii componenţi stabiliţi în celula eucariotă. După ce endosimbionţii au căpătat un habitat intracelular permanent, peretele celular al precursorilor mitocondriilor şi cloroplastelor a devenit inutil. Pierderea capacităţii de a face sinteza peptidoglicanilor şi deci a peretelui celular a fost una din primele faze ale evoluţiei mitocondriilor şi cloroplastelor. Într-o perioadă tardivă a evoluţiei, cînd pereţii celulari au căpătat o valoare adaptativă la unele linii de eucariote (alge, fungi etc.), problema sintezei lor a fost rezolvată pe căi noi şi diferite, după cum atestă soluţiile moleculare diferite (Stanier, 1976). Final, o modificare de structură a sistemului genetic a asigurat permanenţa endosimbionţilor respiratori şi fotosintetici: scoaterea unor determinanţi genetici din genoforii endosimbionţilor şi încorporarea lor în genoforii nucleari ai gazdei, prin care endosimbionţii şi-au pierdut statutul de organisme, dobîndindu-l pe acela de organite.

Argumente în favoarea ipotezei endosimbiozei

Numeroase exemple de asociaţii endosimbiotice, care se pot observa şi în prezent, pledează în favoarea ipotezei reformulată cu sprijinul cunoştinţelor actuale de Lynn Sagan-Margulis (1971). Endosimbiozele (numite astfel datorită prezenţei microorganismelor simbionte chiar în interiorul celulelor sau ţesuturilor organismelor-gazdă) pot fi neereditare (netransmisibile) şi ereditare.

Cea mai cunoscută formă de endosimbioză neereditară este întîlnită în cazul bacteriilor fixatoare de N_2, din genul *Rhizobium*, şi plantelor leguminoase, care nu se transmite la descendenţi şi, ca atare, fiecare nouă generaţie de plante trebuie să restabilească asocierea cu o nouă generaţie de bacterii. În schimb, în cazul plantei *Psychotria bacteriophila*, bacteriile simbionte sînt transmise prin sămînţă în aşa fel încît plantele care rezultă moştenesc nu numai particularităţile organismului parental, ci şi bacteriile. Un exemplu similar este furnizat de simbioza ereditară dintre alga verde fotosintetizantă şi „protozoarul verde" *Paramecium bursaria* (numit aşa datorită numărului mare de alge pe care le conţine), ale cărei particularităţi au fost studiate în laborator. Cînd protozoarul-gazdă este ţinut în condiţii de înfometare, alga simbiotică suplineşte nevoile de hrană, cît timp dispune de lumina necesară pentru fotosinteză. Lipsit de alge, protozoarul supravieţuieşte numai dacă i se adaugă nutrienţi. În schimb, algele îndepărtate din protozoare pot trăi libere (Stegel şi Karakasian, citaţi de Margulis, 1970). Simbioza poate fi reconstituită în laborator prin punerea în contact a celor doi parteneri izolaţi. Alga pătrunde în interiorul protozoarului şi se multiplică, dar numai pînă cînd atinge pragul de densitate controlat genetic, după care multiplicarea este oprită. Dacă protozoarul întîlneşte alge libere, le digeră prompt, în timp ce partenerul său endosimbiotic este imun. Lucrurile se petrec ca şi cum protozoarul îşi recunoaşte propriul simbiont, deşi acesta nu prezintă deosebiri morfologice majore faţă de echivalentul său liber, nici la microscopul electronic.

În unele cazuri, simbiozele au un caracter complex. Astfel este protozoarul flagelat *Myxotricha paradoxa*, prezent în intestinul termitelor australiene (*Mastotermes darwinensis*), cu rol ajutător în digestia lemnului pulverizat şi deci în supravieţuirea insectei. El a fost descris ca un organism mare, unicelular, avînd suprafaţa acoperită de un număr mare de flageli de diferite dimensiuni. Cleveland şi Grimstone (1964) au demonstrat că, în realitate, protozoarul are numai cîţiva flageli, localizaţi la una din extremităţi, ceilalţi fiind reprezentaţi de mii de spirochete mari, din genul *Pillotina*, care trăiesc simbiotic pe suprafaţa lor (Hollande şi Garagozlou, 1967). Fiecare spirochetă este asociată cu un alt tip de bacterie simbiotică ataşată de suprafaţa protozoarului-gazdă, care adăposteşte, în plus, în interiorul său, un al treilea tip de bacterie simbiotică. Protozoarul alunecă neîntrerupt prin intestinul termitelor, cu viteză constantă, obişnuit în linie dreaptă, datorită agitaţiei viguroase a spirochetelor (Cleveland, 1964; Margulis, Chase şi To, 1979).

Unele procese de endosimbioză au fost induse şi experimental ca, de exemplu, în cazul unor bacterii iniţial nocive, care infectînd o colonie de *Amoeba discoides* se adaptează şi devin endosimbionte inofensive. În decursul observaţiei, de-a lungul a cinci ani, au fost observate ~ 1 000 de generaţii de amoebe care conţin bacterii endosimbionte permanente. Experienţa

este semnificativă pentru posibilitatea instalării unei relaţii simbiotice, deşi, în acest caz, celula-gazdă este eucariotă (Kwang Jeon, 1972, 1976).

Echlin (1966) citează numeroase exemple de cianobacterii, similare cloroplastelor de la eucariote, asociate endocelular (endosimbiotic) cu foarte diferite organisme-gazdă ca: unele diatomee *(Rhopalodia)*, alge verzi lipsite de cloroplaste *(Gloeochaeta, Glaucocystis)*, flagelate incolore *(Peliaina* şi *Cyanophora)*, amoebe *(Pauleinella)*, fungi din grupul *Phycomycetes (Geosiphon pyriforme)* (Droop, 1963) etc., în care relaţiile nutriţionale sînt încă neelucidate. În aceste cazuri, cianobacteriile şi-au pierdut capacitatea de a supravieţui în afara celulei-gazdă, dar nu se cunosc ce avantaje au în urma endosimbiozei, în afară de protecţia oferită de celula-gazdă. ,,Cianelele"*) din *Cyanophora paradoxa* păstrează, pe lîngă peretele peptidoglicanic, şi mari asemănări ultrastructurale cu cianobacteriile libere, ceea ce sugerează că ar fi recent derivate din procariote endosimbionte. Ele au un genom cu dimensiuni similare celui al plastidelor ($1{,}2 \times 10^8$ dal) şi reprezintă, după Herdmann şi Stanier (1977), un argument puternic în favoarea ipotezei endosimbiotice. Un argument puternic la nivel molecular îl constituie faptul că secvenţa nucleotidelor în cazul ARNr 16 S din cloroplaste şi mitocondrii prezintă un grad de înrudire mult mai mare cu cel din cianobacterii şi bacteriile obişnuite, decît cu ARNr 18 S din citoplasmă.

Una dintre consecinţele imediate ale ipotezei endosimbiotice este aceea că apariţia eucariotelor a avut loc într-o fază relativ tardivă a evoluţiei celulare. Acest eveniment a fost precedat de evoluţia organizării celulei procariote, de diversificarea ei într-o gamă largă de tipuri diferite, care au evoluat separat şi au devenit genitorii organitelor. În felul acesta, procariotele au fost aproape jumătate din istoria Pămîntului, respectiv o bună parte din cele două miliarde de ani ai evoluţiei celulare, singurii locuitori ai acestei planete.

Ipoteza lui De Duve

Într-o variantă a ipotezei endosimbiozei, De Duve (1969, 1973) consideră că fagocitele primordiale care au înglobat acum 1,5 miliarde de ani strămoşii bacterieni ai mitocondriilor au fost celule aerobe care au avut un metabolism oxidativ respirator bazat pe peroxisomi**), în locul lanţului transportor de electroni. Încercînd să traseze istoria evolutivă a peroxisomilor, De Duve consideră că aceştia au avut o importanţă metabolică mult mai mare în trecut decît la plantele şi animalele actuale.

După ipoteza sa, atît endosimbiontul, cît şi celula-gazdă şi-au avut originea într-o bacterie aerobă primitivă, dotată cu un tip de respiraţie peroxisomală ($O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O$). Una dintre liniile de evoluţie a dus la apariţia lanţului respirator şi a sistemelor de fosforilare, iar cealaltă a dobîndit capacitatea de endocitoză şi de digestie intracelulară, de proliferare a membra-

---

*) Cianelele sînt corpi fotosintetizatori, prezenţi în anumite alge, a căror natură (cianobacterii sau cloroplaste tipice) este greu de stabilit cu certitudine.

**) Peroxisomii sînt organite sferice (~0,3–1,5 μm Ø), delimitate de membrane, prezenţi numai în celulele vegetale şi animale. Conţin un material fin granular şi, în unele ţesuturi, un ,,nucleoid" avînd uneori o aranjare paracristalină a unor subunităţi tubulare. Peroxisomii conţin numeroase enzime implicate în metabolismul peroxidului de hidrogen.

nelor intracelulare şi de creştere a dimensiunilor celulare. Cele două linii evolutive au corespuns la două căi distincte şi, probabil, mutual incompatibile, de diferenţiere a membranei celulare. Dobîndirea unor mitocondrii mai eficiente ar explica declinul evolutiv al peroxisomilor. Natura aerobă a celulei protoeucariote ancestrale, determinată de prezenţa unui sistem respirator primitiv şi relativ puţin eficient, face ca dobîndirea mitocondriilor — simbiont aerob — să fie avantajoasă.

Ipoteza originii endosimbiotice a mitocondriilor

Munjal şi Nickerson (1973) propun o variantă a ipotezei originii endosimbiotice a mitocondriilor bazată pe asocierea unui organism primitiv — *protomitocondria* — cu arhetipul unei celule eucariote (fig. 240).

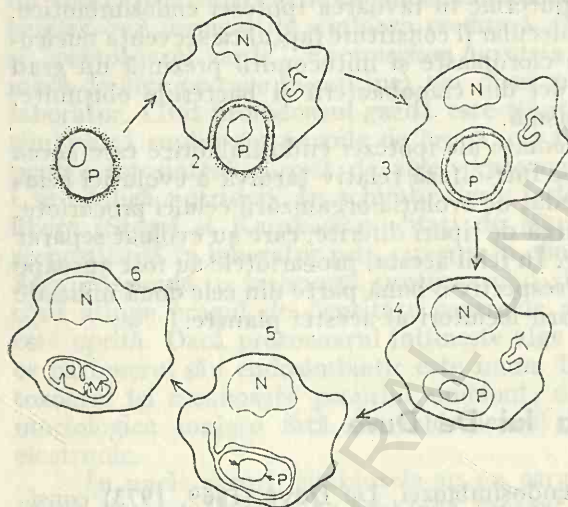


Fig. 240. — Originea endosimbiotică a mitocondriilor, după ipoteza lui Munjal şi Nickerson (1973). 1. Protomitocondria (P), conţinînd ADN circular, se asociază cu o celulă eucariotă (2) cu nucleu (N). 3. După înglobare, protomitocondria este acoperită de restul membranei celulei eucariote, care ulterior este virtual îndepărtată (4). 5. Protomitocondria este înconjurată de reticulul endoplasmatic, care apasă pe membrana internă, pentru a forma cristele mitocondriale (6). Ruperea moleculei de ADN (--→←--), urmată de pierderea unor gene determină formarea de ADN mitocondrial.

În acest model, protomitocondria, avînd o structură similară celulelor procariote (respectiv un genom alcătuit din ADN circular, echipamentul de sinteză a proteinelor şi mecanismele de utilizare a O_2 ca sursă de energie, acoperite de o membrană celulară delimitantă şi de un înveliş celular) (1), se asociază cu o celulă eucariotă (2) care posedă un nucleu „adevărat" şi reticul endoplasmic. După incorporare, prin fagocitoză, protomitocondriile sînt acoperite de o membrană derivată din porţiunea membranei celulei eucariote care a format vezicula fagocitară (3). În etapa următoare, protomitocondria pierde atît membrana externă, cît şi învelişul celular (4), după care este acoperită de o membrană derivată din reticulul endoplasmatic. În cursul acestui proces, protomitocondria este expusă unor compresiuni fizice. Se produce o rupere a moleculei de ADN cromosomal, cu pierderea unei bune părţi din structura acestuia (5) şi apariţia unor invaginări tridimensionale, care formează cristele mitocondriale (6). În cele din urmă, mitocondria este acoperită de o membrană derivată din reticulul endoplasmatic şi de o membrană internă provenită din membrana protomitocondrială.

IPOTEZELE DEZVOLTĂRII CONTINUE

Numite şi *ipoteze ale evoluţiei (filiaţiei) directe* sau ale *autogenezei* („Developmental theories"), aceste ipoteze admit că genomurile nucleare şi cele ale organitelor au devenit fizic compartimentate şi funcţional specializate într-o singură celulă, prin divergenţă de la structuri genetice de tipul cromosomului şi/sau plasmidelor actuale, prezente dinainte în celula respectivă. În felul acesta, structurile şi funcţiile celulelor eucariote s-ar fi dezvoltat treptat de la simple rudimente într-o celulă procariotă. Aceste ipoteze au fost propuse sub numeroase variante, dintre care le prezentăm sintetic pe cele mai importante.

Teoria tradiţională a evoluţiei

Propusă de Allsopp (1969), această ipoteză consideră că în evoluţia treptată a eucariotelor din procariote un rol esenţial l-au avut tilacoizii şi, probabil, mezosomii unor cianobacterii, care au furnizat materialul din care s-au format organitele. Mitocondriile s-ar fi format prin pierderea capacităţii de fotosinteză de către tilacoizi. Aparatul Golgi ar reprezenta rămăşiţe ale tilacoizilor. Organitele, iniţial incapabile de diviziune, ar fi căpătat această proprietate după ce au înglobat o moleculă de ADN.

Teoria autogenezei

Numită şi teoria *dezvoltării continue*, a fost propusă de Taylor (1974), care consideră că evoluţia celulelor eucariote ar avea loc în 7 stadii succesive (I—VII), ipotetice, definite în termeni structurali. La baza evoluţiei tuturor celulelor eucariote ar sta un organism primitiv ipotetic, similar cianobacteriilor — Uralga — având capacitatea de respiraţie şi fotosinteză şi un genom cu organizare tipic procariotă (I). În faza următoare, în regiunea centrală a acestor celule s-ar dezvolta un nucleoid mare (II), care ar fi înconjurat de membrane şi transformat în nucleu tipic eucariot (III). Ulterior, membranele se specializează în sensul funcţionării lor, fie ca unităţi structurale pentru respiraţie, fie pentru fotosinteză. Membrana nucleară pierde ambele funcţii (IV). Dispariţia peretelui celular conferă celulei proprietatea de endocitoză, respectiv capacitatea de a îngloba diferite particule din mediu. Mitocondriile şi plastidele se acoperă cu membrane printr-un mecanism similar celui descris de Uzzel şi Spolsky (fig. 242). Apar microfibrilele şi microtubulii (V). Diferenţierea în continuare a sistemelor de membrane şi a matricei celulare permite desfăşurarea intensă a endo- şi exocitozei (VI). Sistemele microtubulare se organizează în grupuri de $2 \times 9 + 2$, formînd flageli sau cili şi odată cu aceasta celula eucariotă este completă (VII).

Originea nesimbiotică a mitocondriilor. Ipoteza „plasmidei". Modelul lui Raff şi Mahler

Spre deosebire de teoria endosimbiozei, care consideră că celulele eucariote au apărut prin pătrunderea unui endosimbiont aerob într-o celulă protoeucariotă anaerobă, Raff şi Mahler (1972) consideră că protoeucariotele

au fost celule relativ evoluate, aerobe, mai mari decît procariotele tipice, fapt care implică nevoia unor suprafețe cît mai mari ale membranelor cu rol în respirație. Cunoscînd funcția respiratorie a membranei plasmatice la procariote, modelul lui Raff și Mahler consideră că această exigență a fost satisfăcută prin invaginarea membranei celulare și formarea unei vezicule delimitate de membrane, care ulterior s-au separat, rămînînd libere în citoplasmă. Particulele respiratorii veziculare erau topologic structuri închise, delimitate de o membrană, care constituia o barieră de permeabilitate selectivă între componenții respiratorii și citoplasmă (fig. 241). În felul acesta s-a creat un

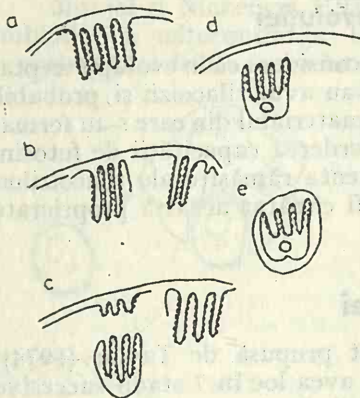


Fig. 241. — Originea mitocondriilor după ipoteza lui Raff și Mahler (1972). a. Secțiune printr-o celulă protoeucariotă prezentînd un fragment de membrană celulară invaginată cu funcții respiratorii. b. Creșterea celulei protoeucariote mărește nevoia de suprafață respiratorie, care este satisfăcută prin adîncirea invaginărilor membranare (b) și formarea unor structuri veziculare topologic închise, corespunzînd organitelor respiratorii (c) de tip protomitocondrial. d. Stabilirea intracelulară a unei plasmide (reprezentată printr-un cerc), care conține gene purtînd informație pentru constituenții ribosomali și pentru unele elemente ale membranei respiratorii. e. În etapa finală, viitoarea mitocondrie este acoperită de o membrană externă.

dispozitiv avantajos din punct de vedere evolutiv și posibilitatea unei reglări mai sofisticate a metabolismului respirator. Membrana veziculelor respiratorii era permeabilă pentru multe proteine, inclusiv pentru citocromul *c* și enzimele secvențelor de respirație și fosforilare, dar impermeabilă pentru citocrom oxidază, pentru ribosomi și ARN ribosomal. Întrucît sinteza acestor constituenți *in situ* nu era posibilă, la început a fost necesară înlocuirea permanentă *de novo* a organitelor respiratorii prin invaginarea membranei celulare. Întrucît acest turnover permanent era neeconomic, organitele respiratorii au dobîndit un mare avantaj biologic, prin implantarea de la exterior a unui sistem de sinteză proteică apt să acopere nevoile în aceste substanțe. Acest proces s-a realizat prin încorporarea stabilă a unei plasmide, care conținea gene pentru constituenții ribosomali și pentru unele elemente respiratorii. Prin acest mecanism, veziculele respiratorii (protomitocondriile) au devenit mitocondrii funcționale.

Ipoteza este susținută și de Meyer (1973) și Perlman (1973). Sonea (1972), într-o variantă a ipotezei „plasmidei", consideră că apariția și dezvoltarea rapidă a eucariotelor s-ar putea explica prin acumularea, asamblarea și captivarea unor plasmide sau altor repliconi mici similari (genomuri de fag temperat), care erau purtate anterior numai ocazional de celula procariotă ancestrală. Utilitatea lor ca gene suplimentare pentru celula eucariotă ancestrală a favorizat selecția lor rapidă.

Ipoteza sechestrării prin membrane

Bazată pe concepţia lui Stanier referitoare la rolul esenţial al invaginărilor membranei celulare în diferenţierea celulelor eucariote, ipoteza sechestrării prin membrane (Uzzel şi Spolsky, 1974) este o variantă a ipotezei lui Raff şi Mahler. Invaginarea membranei celulare ar permite, pe de o parte, formarea unei membrane duble în jurul genomului nuclear şi, pe de altă parte, sub presiunea selecţiei, ar putea, cînd cresc necesităţile celulare de respiraţie şi fotosinteză, ,,să sechestreze" aceste funcţii în organite specifice, prin formarea membranelor mitocondriale şi ale cloroplastelor. În acest proces, prezentat schematic în fig. 242, iniţial ar avea loc replicarea genomului, neînsoţită de diviziune celulară, urmată de invaginarea membranei lîngă situsurile de legare ale genomurilor şi formarea de structuri dublu membranare în jurul fiecărui genom ataşat pe suprafaţa internă a membranei interne. Iniţial, structurile nucleare şi organitele erau, probabil, foarte asemănătoare şi, după Uzzel şi Spolsky, toate conţineau cîte un genom complet. Ele manifestau, pe lîngă funcţia nucleară, activităţi respiratorii şi de fotosinteză legate de membrane. Cu timpul a apărut diferenţierea funcţională progresivă: membrana nucleară şi-a pierdut activităţile respiratorii şi de fotosinteză care au rămas sechestrate în mitocondrii, respectiv în cloroplaste. Ulterior, capacitatea respiratorie şi de fotosinteză a crescut prin mărirea suprafeţei active a membranei organitelor, determinată de invaginări repetate. Succesiunea

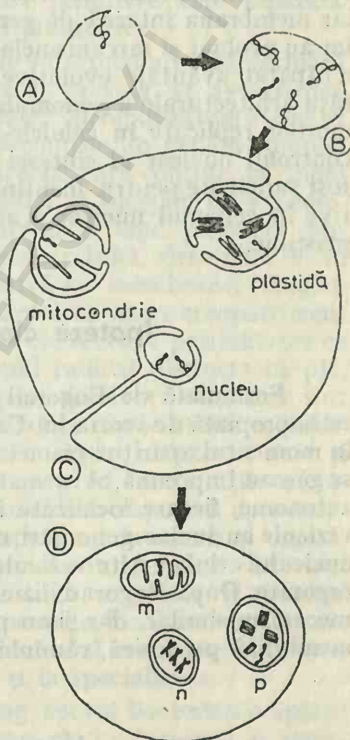


Fig. 242. — Formarea organitelor după ipoteza lui Uzzel şi Spolsky (1974). A. Celulă procariotă. B. Duplicarea genomurilor procariote. C. Invaginarea membranei celulare determină formarea învelişurilor duble ale nucleului, mitocondriilor şi plastidelor. Secvenţa fazelor în timp nu este cunoscută. D. Celulă eucariotă. Nucleul (n) se măreşte şi se diferenţiază. Genomurile organitelor pierd o parte din determinanţii genetici.

în timp a acestor procese nu este cunoscută. În timp ce genomul nuclear a crescut ca mărime prin duplicarea adițională (Ohno, 1970) și s-a diferențiat extrem de mult, genomul organitelor a pierdut multe gene și s-a simplificat.

Pentru a explica diferențele dintre membrana externă și cea internă a organitelor, care sînt în dezacord cu ipoteza formării lor ca o unitate continuă derivată din membrana celulară, Uzzel și Spolsky consideră că sinteza proteinelor celor două membrane ar fi codificată de gene situate în genomuri diferite: membrana externă ar fi integral codificată de genomul nuclear, iar membrana internă de genomul organitelor. În cursul evoluției eucariotelor au evoluat și mecanismele de control ale genelor. Ca urmare, ADN nuclear a căpătat avantaje evolutive pentru o serie de funcții, ca menținerea integrității arhitecturale a genomului, reglarea sintezei de ARNm, distribuția genomurilor replicate în celulele-fiice etc. Avantajele adaptative, decurgînd din controlul nuclear al sintezei unor proteine din mitocondrii și cloroplaste, au fost suficiente pentru menținerea cistronilor care codifică proteinele respective în genomul nuclear și au permis pierderea lor din ADN mitocondrial și plastidic.

Ipoteza clonării agregatelor de gene

Formulată de Bogorad (1975) („cluster-clone theory"), această ipoteză este apropiată de teoria lui Uzzel și Spolsky. Bogorad consideră că înainte sau în momentul apariției primelor celule eucariote, toate genele, ca și produșii lor se găseau împreună. A urmat separarea genelor în grupuri („cluster") semiautonome, fiecare localizate într-o veziculă delimitată de membrane. Unele vezicule au inclus genomuri complete și au realizat condiția pentru formarea nucleului celular. Alte vezicule au înglobat genomuri fragmentate și au devenit organite. După Bogorad, lizosomii și aparatul Golgi au luat naștere printr-un mecanism similar, dar și-au pierdut toate genele și odată cu aceasta și dubla membrană periferică, rămînînd înconjurate de o membrană monostrat.

Ipoteza „duplicarea ADN — compartimentare — dominare"

Propusă de Reijnders (1975), această ipoteză consideră că mitocondriile s-ar fi format prin duplicarea ADN într-o celulă procariotă, urmată de „capturarea" și închiderea celor două molecule în compartimente *separate*, rezultate prin invaginări ale membranei celulare. În felul acesta s-ar fi format în jurul cîte unei molecule de ADN, pe de o parte, membrana unei protomitocondrii, iar, pe de altă parte, membrana nucleară. După separarea moleculelor de ADN și compartimentarea lor, s-ar fi realizat o asociere stabilă cu celula și o acțiune de eliminare a informației genetice redundante din protomitocondrie, care a furnizat instalarea unui control centralizat al activităților celulare („dominarea") de către nucleu și respectiv „subjugarea" („enslavement") mitocondriei. Treptat, procesul a dus la specializarea celor două organite, nucleul și mitocondria.

Ipoteza compartimentării intracelulare

Gould şi Dring (1979) consideră că la originea celulelor eucariote a stat un proces de compartimentare a citoplasmei unui procariot primitiv, printr-un mecanism analog formării endosporilor actuali: diviziunea asimetrică a protoplastului unei bacterii şi separarea celor două compartimente celulare rezultate. În acest proces, celula-mamă a înglobat practic o porţiune din propria sa citoplasmă, printr-un mecanism similar celui descris de Raff şi Mahler, în care o parte din citoplasma celulei primitive este separată de rest prin creşterea sau invaginarea membranei plasmatice.

După Gould şi Dring, unul dintre stadiile intermediare ale formării sporului, acela de celulă vegetativă care include un prespor, ar avea caracteristicile morfologice şi biochimice fundamentale, corespunzătoare celulei eucariote ancestrale, respectiv o citoplasmă care conţine un genom complet şi, în plus, un organit delimitat de o membrană dublă, care conţine, la rîndul său, un genom propriu complet, ribosomi şi, probabil, la început, un set complet din enzimele celulei. Compartimentarea internă a unui procariot primitiv ar fi conferit numeroase avantaje potenţiale celulei, determinate, în principal, de proprietăţile de permeabilitate selectivă ale membranei (Hughes şi Brightwell, 1970; Raff şi Mahler, 1973) şi de faptul că acest compartiment închis nu mai este în contact direct cu mediul. Se creează posibilitatea ca aceeaşi celulă să menţină în ea însăşi două medii radical distincte ca pH, conţinut în apă, natura şi concentraţia substanţelor dizolvate etc., care sînt optime pentru diferitele tipuri de activităţi metabolice (fotosinteză, metabolism oxidativ, glicoliză etc.). Important pentru evoluţia ulterioară este şi faptul că celula-mamă poate controla, în oarecare grad, activităţile metabolice ale compartimentului inclus în ea, în special sub raportul aprovizionării cu nutrienţi şi substanţe dizolvate. La început, celula-mamă şi organitul au genomuri identice. Pierderea genelor, în special din genomul viitorului organit, a dus la dependenţa acestuia de celula-mamă, respectiv de genomul „matern". Diferitele modificări apărute în genomurile localizate în fiecare din compartimente au dus la diferenţe în complementul enzimatic al celulei-mamă şi al organitului, la „diviziunea muncii" şi la specializare.

În concluzie, după ipoteza lui Gould şi Dring, sporul bacterian a apărut în Precambrian, ca produs înalt specializat al unei căi evolutive şi ar reprezenta rezultatul unei căi *sui generis* de endocitoză, care a început sub forma unei diviziuni celulare modificate, urmată de înglobarea unuia din produşii diviziunii. Evoluţia alternativă spre o direcţie diferită de aceea care a determinat latenţa extremă a endosporului a dus la situaţii fundamental diferite: pe de o parte, celula-mamă exercită asupra compartimentului închis în interiorul ei forme variate de control metabolic, iar, pe de alta, apar interacţiunile complexe, între citoplasma celulelor eucariote şi organitele pe care le conţine. Ipoteza nu explică mecanismul de formare al cloroplastelor.

Ipoteza citozei

După Cavalier-Smith (1975), particularităţile nucleului eucariot (prezenţa membranei nucleare cu pori, a cromosomilor neidentici, lineari, şi a diviziunii mitotice), care reprezintă „condiţia eucariotă însăşi", îşi au originea

în evoluţia procesului de endocitoză, ce a furnizat presiunea selecţiei şi mecanismul de compartimentare prin membrane care au dus la apariţia nucleului şi a organitelor.

Celula primordială a fost o cianobacterie facultativ fototrofă, care şi-ar fi pierdut peretele celular şi genele care asigură sinteza lui, devenind o formă L, capabilă de fagocitoză. Trăind într-un mediu bogat în bacterii şi substanţe organice reziduale, cianobacteria tip L făcea ziua fotosinteză, iar noaptea îngloba nutrienţi prin fagocitoză. Datorită fagocitozei, suprafaţa membranei plasmatice s-a redus, dezvoltîndu-se compensator membranele interne ale fagosomilor. Continuarea procesului a fost condiţionată de apariţia exocitozei. Cavalier-Smith consideră că ambele procese reunite sub denumirea de *citoză* sînt asociate cu prezenţa microfibrilelor de actomiozină, a cărei apariţie ar reprezenta inovaţia moleculară ce face posibilă evoluţia. În continuare, celula dobîndeşte capacitatea de mişcare amoeboidă, de producere de curenţi citoplasmatici şi de fagocitoză în orice punct al membranei celulare, devenită foarte mobilă. Apar microtubulii şi, cu aceasta, începe evoluţia diviziunii mitotice, condiţia prealabilă pentru existenţa unor celule dotate cu genomuri mai mari. Creşterea mărimii genomului furnizează materialul brut pentru evoluţie şi are drept urmare ruperea cromosomilor la nivelul unor secvenţe palindromice şi transformarea lor lineară.

După Cavalier-Smith, apariţia citozei reprezintă un atribut esenţial şi universal al eucariotelor, deoarece furnizează mijlocul de compartimentare a materialelor celulare în nucleu, mitocondrii, plastide, lizosomi etc. prin invaginări ale membranelor celulare şi ale tilacoizilor.

ORIGINEA GENOMULUI EUCARIOT

Celulele eucariote se deosebesc, în primul rînd, de cele procariote prin existenţa unui genom dispers, corespunzînd informaţiei genetice din nucleu („închisă" într-o membrană nucleară), şi celei din organite (respectiv din mitocondrii şi cloroplaste). Eucariotele prezintă şi alte deosebiri importante legate de structura moleculară a genomului, de replicarea şi exprimarea lui în cursul transcrierii şi traducerii genetice*). Aceste mari diferenţe pot fi explicate pe două căi, în lumina ipotezelor şi concepţiilor actuale asupra originii şi evoluţiei vieţii:

1) Genomul nuclear eucariot ar fi derivat relativ recent (în ultimele 1—2 miliarde de ani) dintr-un genom ancestral eubacterian, care a suferit o reorganizare structurală rapidă şi fundamentală. Strămoşii posibili au fost cianobacteriile (Allsopp, 1969; Taylor, 1976; Margulis, 1981), *Mycoplasma* (Maniloff, 1976; Ghosh, 1978), *Myxobacteria* (Wallace, 1973), *Actinomycetes* sau derivaţi ai *Rhodospirillaceae*-lor (Uzzel şi Spolsky, 1974). Diferenţele fundamentale dintre eucariote şi eubacterii au luat naştere după „închiderea" nucleului lor în membrana nucleară şi au fost fie consecinţa acestui proces, fie a înglobării prin endosimbioză a protoorganitelor. Unele modificări pot fi considerate necesare, reprezentînd un avantaj selectiv pentru eucariote faţă de procariote (spre ex., „închiderea" în membrană nucleară a genomului mare, fragmentat, care trebuie replicat şi segregat,

*) Problema va fi prezentată în detaliu în vol. III.

şi a ARNm care trebuie protejat în drumul său din nucleu spre citoplasmă). Multe dintre celelalte proprietăţi (distrugerea unei grupări preexistente, economice, a genelor în operoni — unităţi de transcriere reglate coordonat —, introducerea de secvenţe nucleotidice intercalate fără semnificaţie de codificare de tipul intronilor, acumularea de ADN în exces, înlocuirea unei ARN-polimeraze cu trei ARN-polimeraze, reorganizarea genelor pentru ARNr, modificările în structura şi funcţia ribosomilor) sînt greu de explicat pe această cale (Gray şi Doolittle, 1982).

2) După cea de-a doua ipoteză, este posibil ca particularităţile biologiei moleculare tipic eucariote să fie expresia unor caractere primitive, prezente încă înainte de apariţia primei celule eucariote (protoeucariote) şi nu rezultatul final al unei adaptări (Woese şi Fox, 1977; Darnell, 1978; Doolittle, 1980; Reanney, 1982; Gray şi Doolittle, 1982).

Cele două căi de evoluţie — eubacteriană şi eucariotă — au devenit divergente într-o fază timpurie a evoluţiei celulare de la un strămoş comun în care organizarea genomului, exprimarea şi reglarea acestuia nu erau rezolvate, în aşa fel încît fiecare linie de evoluţie a urmat căi separate şi a ajuns la soluţii separate şi independente. Singura obiecţie majoră este că linia ancestrală de evoluţie propusă, avînd probabil o organizare celulară procariotă şi o biologie moleculară de tip eucariot, nu are supravieţuitori cunoscuţi printre diferitele categorii actuale de eubacterii. Este posibil însă, ca aceştia să fie reprezentaţi în prezent de arhebacterii (Gray şi Doolittle, 1982). Cu toate aceste divergenţe de opinii, concluzia, aproape unanim acceptată, este aceea că toate genomurile contemporane (inclusiv cele din plastide şi mitocondrii), derivă în ultimă instanţă dintr-un singur genom, aparţinînd unei entităţi unice — probabil celulară — care a fost strămoşul tuturor formelor actuale de viaţă. Acest punct de vedere este în acord cu caracterul „aproape universal" al codului genetic. Excepţiile de la codul genetic „standard" prezente în genomurile mitocondriale sînt prea mici şi prea variabile pentru a permite concluzia că aceste organite îşi au originea în linii celulare complet separate, care au luat naştere independent din materia neanimată (Gray şi Doolittle, 1982).

ARCHAEBACTERIA

„Descoperirea" arhebacteriilor este legată de studiile lui Woese și Fox (1977) asupra relațiilor filogenetice dintre diferite specii de bacterii, bazate pe compararea secvenței ribonucleotidelor în moleculele de ARNr 16 S. Cu această ocazie, au demonstrat la bacteriile metanogene *Methanobacterium ruminantium* (mezofilă) și *M. thermoautotrophicum* (termofilă) existența unei înrudiri suficient de mari pentru a le putea considera membri ai aceluiași gen sau aceleiași familii și, totodată, a unor deosebiri importante față de aproximativ 200 de specii de procariote tipice *(E. coli, Bacillus* sp., *Anacystis* etc.). Ei au emis ipoteza că bacteriile metanogene ar fi expresia contemporană a celui mai vechi eveniment filogenetic detectat pînă în prezent, divergența lor de la linia principală de evoluție bacteriană antedatînd cu mult apariția primei bacterii „adevărate"*). Cercetările care au urmat au confirmat existența unui grup de bacterii neobișnuite, care pe baza unor proprietăți distincte la nivel molecular nu sînt genealogic nici procariote, nici eucariote. Deși numărul speciilor cunoscute este extrem de mic, în comparație cu cel al eubacteriilor, și deși sînt foarte asemănătoare la un examen superficial, arhebacteriile, ca grup, prezintă un grad de eterogenitate la nivel molecular mai mare decît cel întîlnit la eubacterii. Aceasta permite separarea lor de procariotele tipice la cel mai înalt grad taxonomic (Woese, 1981).

Denumirea de *Archaebacteria* reflectă concepția autorilor, după care aceste microorganisme ar fi cele mai vechi bacterii cunoscute, păstrînd încă o formă de metabolism care pare bine adaptată la condițiile ce au predominat în atmosfera primitivă, în momentul apariției vieții pe pămînt (bogăție în CO_2, prezența unei cantități mici de H_2 și absența O_2). În momentul în care compoziția atmosferei primitive s-a schimbat, arhebacteriile s-au limitat ca răspîndire la o serie de medii speciale, relativ inaccesibile altor categorii de microorganisme.

Grupul arhebacteriilor include, pe lîngă bacteriile metanogene și halofile extreme, și bacteriile termoacidofile. Acestea sînt reprezentate de genurile *Sulfolobus* și *Thermoplasma.*

Genul *Sulfolobus* cuprinde bacterii *(S. acidocaldarius* (Brock, 1974), *S. solfataricus, S. brierleyi)* termofile și acidofile extreme, care trăiesc în izvoare sulfuroase, acide, calde și în fisurile vulcanice. Se dezvoltă la 80°C și chiar peste 90°C, la pH 1,0–4,0, în timp ce limitele de pH intern al bacte-

---

*) Denumirea de „bacterii adevărate" reflectă faptul că cele mai multe date, care au determinat concepția noastră actuală referitoare la bacterii, au fost obținute din studiul acestora.

riei sînt apropiate de 7,0. Marea diferență de pH dintre mediul extern și cel intern are o importanță esențială pentru supraviețuirea în medii extreme și demonstrează, totodată, caracterul special al membranei celulare, care asigură formarea acestui gradient foarte accentuat de pH, cu rol deosebit în pomparea în și din celulă a diferitelor substanțe dizolvate. Temperaturile scăzute opresc procesele metabolice. Odată cu aceasta, limitele normale de pH intern nu mai pot fi menținute și bacteriile mor (Brock, 1972).

Bacteriile din genul *Sulfolobus* sînt, în general, sferice, cu ∅ 0,8—1,0 μm, cu mici variații de mărime. Apar frecvent la microscopul electronic cu o formă lobată. Peretele celular, alcătuit din subunități proteice aranjate după un model hexagonal (Brierley, 1982), conține mici cantități de lipide. Fiind lipsit de peptidoglican, acid muramic și acid diaminopimelic nu este afectat de lizozim și nici de antibiotice de tipul penicilinei.

În natură, bacteriile termoacidofile sînt aproape totdeauna autotrofe. Oxidează sulful și fierul în condiții de temperatură și aciditate extreme. Solubilizează („leșiere") metalele din minerale, ca molibdenita și calcopirita, care rezistă la acțiunea altor microorganisme.

Thermoplasma acidophilum este o micoplasmă prezentă la marginea grămezilor de resturi de cărbune care ard mocnit. Lipsită de perete celular, este acoperită de o membrană celulară limitantă. Conține ADN legat de proteine (HTa) similare histonelor, care protejează segmente de ~ 40 perechi de baze (comparativ cu 140 perechi de baze în cromatina eucariotelor, Searcy, 1978, 1980) față de acțiunea DNazelor. La procariote, proteinele leagă specific ADN și îl stabilizează față de denaturarea termică (de exemplu, proteina HU la *E. coli*). *T. acidophilum* ar reprezenta, după ipoteza lui Stacey (1980), strămoșul posibil al celulelor protoeucariote (care conțineau genomul protonuclear) și care a devenit ulterior celula-gazdă a bacteriilor endosimbiotice ce au format mitocondriile și cloroplastele.

Baross și Deming (1983) au izolat două tipuri de bacterii din apele expulzate din craterele unor vulcani submarini („Black smokers"), situați de-a lungul coastei Californiei, corespunzător limitelor dintre plăcile tectonice considerate ca implicate în deriva continentelor. Mediul natural din care s-a făcut izolarea avea ~ 350°C și era situat la o adîncime de 2 600 m și la o presiune de ~ 265 atm (în condițiile respective, apa fierbe numai la 460°C).

În laborator, bacteriile astfel izolate se dezvoltă bine numai la temperaturi superioare celei de 150°C. Durata unei generații este de 8 ore, la 150°C, de 1,5 ore, la 200°C, și de 40 de minute, la 250° și o presiune de 265 atm. Creșterea poate fi apreciată atît prin mărirea numărului celulelor. cît și a masei proteice. Deși mai sînt necesare probe suplimentare, aceste bacterii s-au dezvoltat și la 300°C și chiar peste această limită (Walsby, 1983). Ele au aceiași constituenți ca și bacteriile obișnuite, cu deosebirea că ~ 25% dintre aminoacizii proteinelor lor au o structură neobișnuită, ceea ce ar explica stabilitatea termică atît de mare. Lipidele sînt constituite din acizi grași cu catene ramificate, fapt care conferă o mai mare coeziune membranelor, prin mărirea numărului interacțiunilor hidrofobe. Metabolismul este de tip autotrof. Sînt răspunzătoare de degajările de H_2S, CH_4, H_2 și CO în ocean și aparțin, după toate datele, grupului mare al arhebacteriilor.

Descoperirea acestor bacterii termofile extreme ridică o serie întreagă de probleme, demonstrînd că viața este posibilă în condiții considerate pînă acum ca incompatibile cu existența unei organizări biologice și că a putut

apărea cu mult înainte ca să fi avut loc răcirea Pămîntului (Baross şi Deming, 1983; Walsby, 1983). De asemenea, conform acestor date, este posibil ca mediile naturale supraîncălzite (considerate ca sterile datorită condiţiilor termice speciale) populate de aceste forme de viaţă să fie mult mai numeroase şi mai răspîndite în diferite regiuni ale scoarţei Pămîntului şi poate pe alte planete.

Proprietăţi generale. Arhebacteriile au o serie de particularităţi deosebite fundamental de cele ale eubacteriilor, care în terminologia adoptată de Woese includ toate celelalte procariote (tabelul nr. 43).

În unele cazuri, arhebacteriile sînt lipsite de perete celular. Cînd este prezent, peretele celular poate prezenta patru tipuri majore de structură biochimică, dar nu conţine peptidoglican şi, ca atare, nici acizi muramici, care reprezintă markerii biochimici esenţiali ai eubacteriilor. Membrana celulară are o compoziţie chimică deosebită deoarece lipidele arhebacteriilor sînt foarte diferite de cele întîlnite la bacteriile tipice şi în celulele eucariote. În primul rînd, ele nu conţin acizi graşi liberi şi nici lipide saponifiabile sub formă de esteri ai glicerolului. Din totalul lipidelor celulare, ~ 70—80% sînt lipide polare — de tipul eterilor dintre glicerol şi alcooli poliizoprenoizi. Cele mai importante apar sub formă de C_{20} difitanil-glicerol-dieteri şi C_{40} dibifitanil-diglicerol-tetraeter (fig. 243). Restul lipidelor (~ 20—30%) sînt lipide neutre din categoria hidrocarburilor izoprenoide, aparţinînd unei game largi (C_{14}, C_{20}, C_{25}, C_{30}) de varietăţi, între care domină cele de tip C_{30} (scualen).

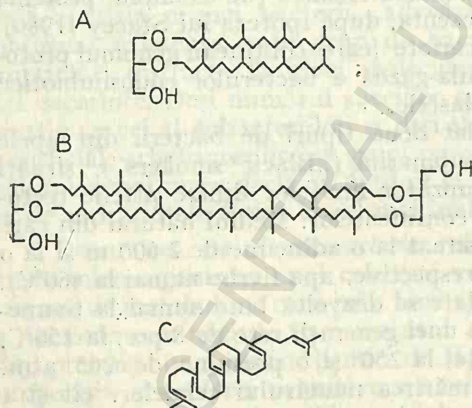


Fig. 243. — A. Structura moleculelor de C_{20}-dieter-difitanil-glicerol şi C_{40}-tetraeter-dibifitanol-diglicerol (B), principalii constituenţi ai fracţiunii lipidice polare a bacteriilor metanogene. C. Structura moleculei de scualen ($C_{30}H_{50}$), hidrocarbură izoprenoidă, prezentă obişnuit în fracţiunea lipidică neutră a bacteriilor metanogene (după Balch şi colab., 1979).

Această compoziţie este deosebit de importantă, pe de o parte, pentru că furnizează prima probă de sinteză microbiană a hidrocarburilor izoprenoide ramificate, avînd un conţinut în C comparabil celui găsit în sedimente şi în petrol, şi, pe de alta, pentru că oferă posibilităţi noi de interpretare a evoluţiei biogeochimice (Tornabene, 1979; Balch, 1979). În plus, configuraţia faţă de atomul de C central al glicerolului* la arhebacterii reprezintă imaginea în oglindă a configuraţiei întîlnite în lipidele membranare ale eubacteriilor şi eucariotelor (fig. 244).

---

*) Glicerolul are doi izomeri optici (în funcţie de configuraţia moleculei faţă de atomul de C central) care rotesc lumina polarizată în direcţii opuse.

Tabelul nr. 43

Caracteristicile moleculare comparative ale arhebacteriilor, eubacteriilor și celulelor eucariote, evidențiind faptul că în unele cazuri arhebacteriile au caractere unice în natură, în timp ce în altele seamănă fie cu procariotele, fie cu eucariotele (modificat după Woese, 1981)

Caracterul		*Archaebacteria*	*Eubacteria*	*Eucaryota*
Dimensiunile lineare medii		~ 1 μm	~ 1 μm	~ 10 μm
Peretele celular		Prezent, de diferite tipuri. Niciodată nu conține acid muramic	Totdeauna conține acid muramic. Varietate (Gram-pozitivă sau Gram-negativă) în cadrul unui tip. Absent la micoplasme	Absent la celulele animale. Structura moleculară diferită la celelalte categorii. Absența constantă a acidului muramic
Membrana celulară (natura lipidelor)		Lanțuri alifatice ramificate cu legături eterice. Absența acizilor grași	Lanțuri alifatice neramificate cu legături esterice. Acizii grași prezenți	Lanțuri alifatice neramificate cu legături esterice. Acizii grași prezenți
Membrana nucleară		Absentă	Absentă	Prezentă
Organitele celulare		Absente	Absente	Prezente
ARNt	Timina*) în brațul „comun"	Absentă	Prezentă la cele mai multe tipuri de ARNt, la cele mai multe specii	Prezentă la cele mai multe tipuri de ARNt, la toate speciile
	Dihidrouracilul*)	Absent (excepție un un singur gen)	Prezent la cele mai multe tipuri de ARNt, la toate speciile	Prezent la cele mai multe tipuri de ARNt, la toate speciile
	Aminoacidul purtat de ARNt inițiator	Metionină	Formilmetionină	Metionină
Ribosomii	Mărimea subunităților	30 S + 50 S	30 S + 50 S	40 S + 60 S în citoplasmă, 30 S + 50 S în mitocondrii și cloroplaste
	Lungimea ARNr 16 S (18 S)	~ 1 500 nucleotide	~ 1 500 nucleotide	~ 1 800 nucleotide
	Lungimea ARNr 23 S (25–28 S)	~ 2 900 nucleotide	~ 2 900 nucleotide	~ 3 500 nucleotide sau peste
	Sensibilitatea la cloramfenicol	Rezistente	Sensibile	Rezistente

*) Baze modificate care înlocuiesc U (uracil) în ARNt.

Tabelul nr. 43 *(continuare)*

Caracterul		*Archaebacteria*	*Eubacteria*	*Eucaryota*
	Sensibilitatea la anizomicină	Sensibile	Rezistente	Sensibile
	Sensibilitatea la kanamicină	Rezistente	Sensibile	Rezistente
Ribosomii	Situsul de legare AUCACCUCC a ARNm la capătul 3′ al ARNr 16 S (18 S)	Prezent	Prezent	Absent
	Factorul de creştere*) al lanţului polipeptidic	Reacţionează cu toxina difterică	Nu reacţionează cu toxina difterică	Reacţionează cu toxina difterică

*) Component al „maşinăriei" de traducere a informaţiei genetice.

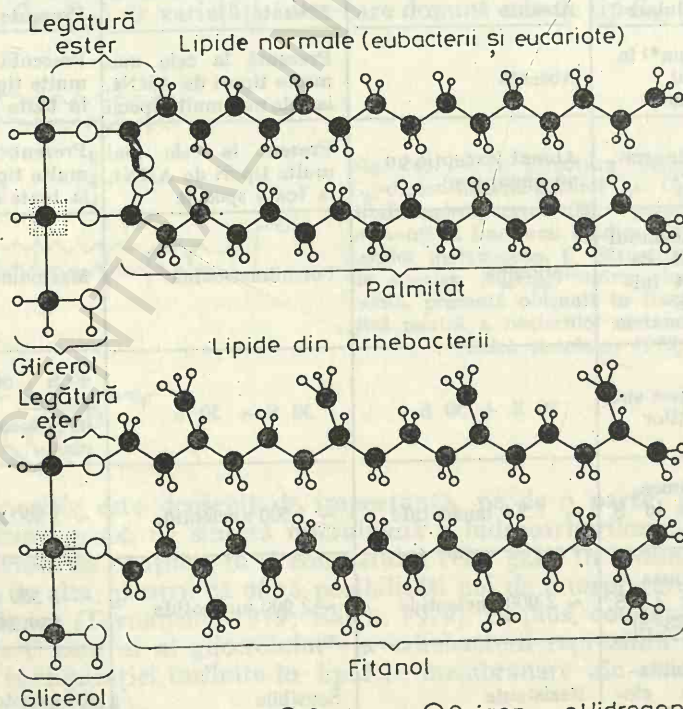


Fig. 244. — Reprezentarea schematică a structurii chimice a lipidelor membranare prezente la eubacterii şi eucariote comparativ cu lipidele arhebacteriilor (după Woese, 1981).

Compoziţia în baze a ADN, indice de măsură standard a diversităţii filogenetice, este cuprinsă între $G + C\% = 27-68\%$ moli.

Arhebacteriile conţin molecule de ARNt lipsite de ribotimidină în masa TΨC*), diferite de cele ale procariotelor tipice. Ribosomii conţin proteine de tip special, iar ARNr are particularităţi deosebite de cel al altor organisme.

În sfîrşit, factorul de creştere al lanţului polipeptidic („elongation factor") este de tip special, fiind caracterizat prin sensibilitate la ribozilarea adenozindifosfatului sub acţiunea toxinei difterice. În plus, bacteriile metanogene prezintă un spectru neobişnuit de coenzime.

RELAŢIILE DINTRE ARHEBACTERII ŞI EUCARIOTE

Dacă asemănările dintre arhebacterii şi procariote nu şochează, cele ale unor halofile extreme (*Halobacterium* şi *Halococcus*) cu celulele eucariote sînt atît de semnificative, încît, deşi se manifestă numai la nivel molecular, par suficiente pentru a le putea considera drept punct de plecare al evoluţiei celulelor de tip eucariot. Aceste proprietăţi, sintetizate de Bayley şi Morton (1978), precum şi de Gray şi Doolittle (1982), pe baza datelor din literatură, sînt următoarele:

1) Prezenţa la *Halobacterium salinarium* a unei glicoproteine majore (g.m. 200 000 dal), reprezentînd 50% din proteina parietală, cu o structură similară glicoproteinelor de pe suprafaţa celulelor eucariote (Mescher şi Strominger, 1976). Acest tip de glicoproteină nu a fost întîlnit niciodată la procariote.

2) Prezenţa bacteriorhodopsinei avînd drept cromofor un izomer al retinalului eucariotelor şi sintetizat pe aceleaşi căi ca şi acesta.

3) Biosinteza β-carotenului pe aceleaşi căi ca la plantele superioare.

4) Transportul aminoacizilor pe căi similare celulelor eucariote.

5) Utilizarea metionil-ARNt nemodificat (tipic eucariot) pentru iniţierea sintezei proteinelor.

6) Prezenţa unei „proteine A" ribosomale (omologă proteinelor L 7/L 12 de la *E. coli)*, care seamănă mult cu proteinele A din ribosomii citoplasmatici ai eucariotelor (Matheson, 1980), avînd o mărime similară cu acestea şi prezentînd omologie în secvenţa aminoacizilor. Cu toate acestea, în mod surprinzător, ARNr halobacterian are o mărime caracteristică pentru eubacterii, iar genele pentru acest ARNr sînt organizate şi, probabil, transcrise într-un mod tipic pentru eubacterii (Hofman, Lau şi Doolittle, 1979).

CONSECINŢELE TEORETICE ALE DEFINIRII CONCEPTULUI DE ARCHAEBACTERIA

Studiul complex al arhebacteriilor demonstrează că aceste microorganisme, deşi sînt în mod cert bacterii şi au prin definiţie o organizare celulară de tip procariot, prezintă o serie de particularităţi de structură şi funcţie la

---

*) T = timidină; Ψ = pseudouridină; C = citidină.

nivel molecular, care le individualizează faţă de bacteriile „adevărate", reprezentînd o ramură evolutivă ce antedatează cu mult apariţia primei bacterii „adevărate", strămoşul bacteriilor contemporane (Woese, 1981). Această descoperire duce la concluzia că tradiţionala concepţie conform căreia organismele vii au apărut de-a lungul a două linii primare de evoluţie — linia procariotă şi linia eucariotă, derivată din cea dintîi — nu corespunde datelor actuale (fig. 245).

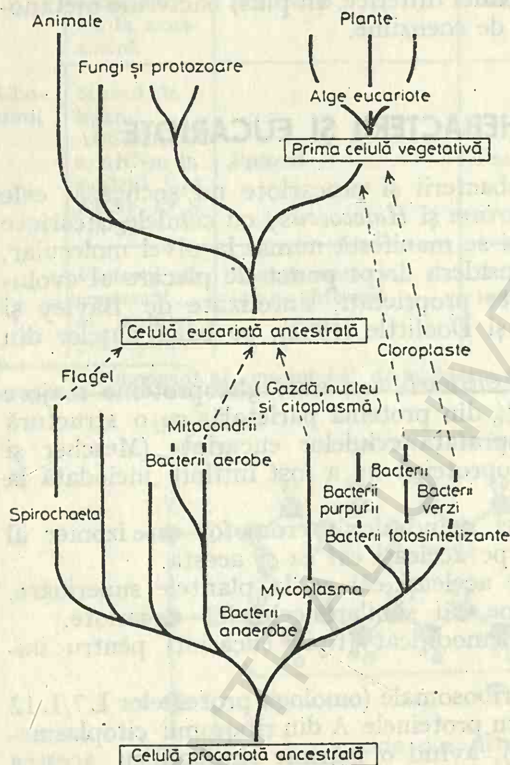


Fig. 245. — Schema evoluţiei organismelor actuale, în acord cu ipoteza endosimbiozei seriale, după o concepţie anterioară descoperirii arhebacteriilor (după Woese, 1981). Primele celule au fost bacteriile anaerobe fermentative, de la care au derivat o serie de alte tipuri. Cînd atmosfera s-a îmbogăţit în O_2, unele celule anaerobe şi-au pierdut peretele celular (*Mycoplasma*) şi au stabilit o relaţie endosimbiotică cu unele bacterii mai mici pe care le-au ingerat. Celula eucariotă ancestrală astfel formată a dat naştere protozoarelor, fungilor, animalelor şi plantelor.

După Woese, raportat la originea şi evoluţia lor, organismele actuale au apărut pe trei căi distincte, corespunzînd următoarelor regnuri primordiale: 1) *Archaebacteria*; 2) *Eubacteria*, corespunzînd organismelor procariote tipice şi 3) *Urkaryotes*. Primele două regnuri primare includ organisme cu organizare procariotă, dar filogenetic echidistante atît între ele, cît şi faţă de eucariote; regnul primar *Urkaryotes* (gr. ur = prefix: primitiv, originar, cel mai precoce în timp) reprezintă un grup ipotetic de organisme, care au avut, probabil, o organizare mai simplă decît bacteriile actuale şi ar corespunde celulei eucariote originare, strămoşul eucariotelor actuale (fig. 246).

Din aceste date rezultă că dihotomia procariote—eucariote la nivel structural (care îşi păstrează valabilitatea, deoarece arhebacteriile, ca şi eubacteriile sînt procariote) a avut consecinţe negative la nivel conceptual, deoarece ea a fost extinsă de la nivelul de organizare celular la nivel molecular şi, mai ales, la cel filogenetic primordial, în sensul că toate organis-

mele vii aparţin obligatoriu uneia din cele două linii primordiale de descendență, procariotă sau eucariotă. Or, după Woese și Fox (1977), ca și după Woese (1981, 1982), datele actuale impun cu necesitate gruparea organismelor vii actuale în funcţie de particularitățile lor de evoluție și structură moleculară în trei categorii distincte, corespunzînd arhebacteriilor, eubacteriilor și organismelor eucariote.

CONCEPŢIILE LUI WOESE ŞI FOX (1977) ŞI WOESE (1981) PRIVIND ORIGINEA VIEŢII

„Descoperirea" arhebacteriilor și stabilirea poziţiei lor în lumea vie au permis formularea unei concepţii originale referitoare la apariţia vieţii și evoluția organismelor vii. În acord cu această concepţie, toate organismele actuale au o origine monoancestrală, avînd ca punct de plecare un strămoș universal, cu potenţialităţi de evoluţie de-a lungul a trei linii de descendență independente, care au evoluat paralel pentru a forma cele trei mari categorii de organisme existente în prezent: arhebacteriile, eubacteriile și eucariotele.

Ancestorul universal al organismelor actuale ar fi fost reprezentat de un nivel de organizare primitivă, corespunzînd unei structuri ipotetice, numită de Woese și Fox (1977) *progenot*, denumire care sugerează importanța informaţiei genetice în apariția organismelor actuale. Progenotul nu a fost procariot, ci probabil mult mai simplu și mai rudimentar decît bacteriile și, ca urmare, funcțiile lui moleculare nu au fost atît de complexe și atît de rafinate ca acelea ale celulelor actuale. Celulele primitive (de tip progenot) au avut mecanisme rudimentare de transcriere și traducere a informaţiei genetice, bazate exclusiv pe acizii ribonucleici sau pe o versiune puţin mai complexă a acestora și pe un număr mic de „gene", care nu produceau copii exacte ale unei anumite proteine, ci o clasă de „proteine statistice", care aveau numai relații de grup cu gena originară. Specificitatea biologică era redusă, iar celulele desfășurau cele mai elementare procese în mod dezordonat. Evoluția progenotului a mers paralel cu evoluția mecanismelor de traducere spre nivele ridicate de acuratețe, pînă cînd s-a stabilit o legătură strictă între genotip și fenotip și odată cu aceasta a apărut specificitatea biologică. Ribosomii progenoţilor aveau greutate moleculară mică, fapt care explică incapacitatea lor de a evita erorile de traducere genetică, întrucît „mașinăriile moleculare" mici nu pot evita stressul termic. Pentru a funcţiona cu acuratețe și a fi aproape rezistenți la perturbările termice, ribosomii au evoluat în sensul măririi dimensiunilor și complexității lor (Burks, 1970; Woese, 1980).

După Woese (1982), ancestorul universal nu a avut caracterul de entitate unică, ci mai degrabă a existat ca o stare de ancestor universal, reflectînd natura și relațiile dintre progenoți și nu unicitatea speciei lor. Lumea progenoților a fost, probabil, alcătuită din entități celulare și subcelulare, semiautonome în care diferitele căi metabolice continuau să apară. Ele se grupau pentru a da forme celulare „laxe", mai puţin specifice, mai puţin integrate, rău definite și efemere. În această fază, probabil că a existat un schimb liber de informaţie genetică și de structuri moleculare între diferite entități subcelulare (gene, plasmide, organite etc.), fapt care a realizat mozaicul molecular al liniilor descendente. Progenotul a funcţionat ca un receptor

de material genetic străin pe care l-a exclus, cînd era nociv, sau l-a păstrat, utilizîndu-l pentru propria sa dezvoltare evolutivă (Woese, 1982). Datorită acestor particularităţi, în perspectivă evolutivă, progenotul poate fi considerat ca o specie unică.

Pe măsură ce progenoţii au evoluat pentru a deveni procariote, nivelul schimbului de informaţie genetică a diminuat, posibil nu în acelaşi timp pentru toate sistemele subcelulare şi pentru fiecare linie de descendenţă (Woese, 1982). Probabil că progenotul întrunea un număr limitat de trăsături comune, ca, de exemplu, acelaşi cod genetic şi o serie de căi biochimice comune celulelor de astăzi. Diferenţele moleculare existente în prezent între diverse categorii de organisme ilustrează rafinamente ale diferitelor funcţii, care au apărut probabil separat în cele trei linii de descendenţă primitive, după ce s-a produs divergenţa lor de ancestorul universal, ca urmare a tendinţei de perfecţionare a unor funcţii moleculare (fidelitatea biosintezei proteinelor, rafinarea mecanismelor de reglare genetică, adaptarea unor structuri moleculare şi anatomice etc.). Evoluţia divergentă de la progenot a avut loc înainte ca acesta să ajungă nivelul de complexitate caracteristic celulelor procariote, sub forma a două linii primare de evoluţie — *Archaebacteria* şi *Eubacteria* — căreia, într-o etapă ulterioară, tardivă, i s-a adăugat linia de evoluţie *Eukaryotes* (fig. 246).

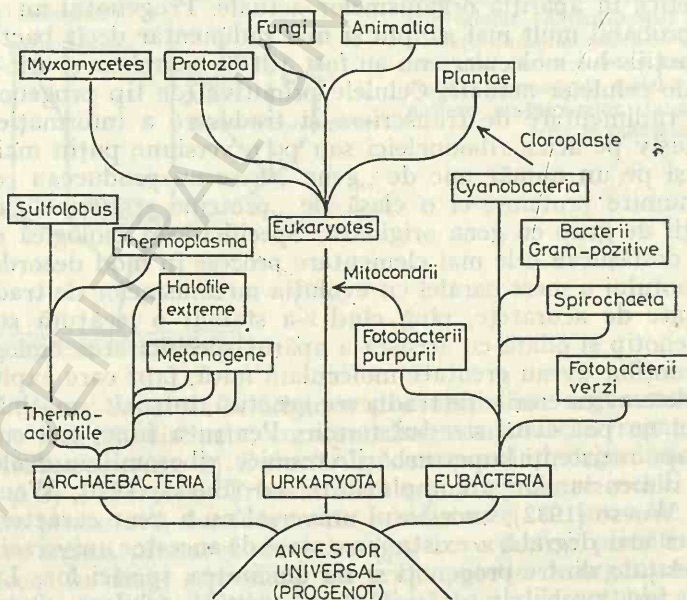


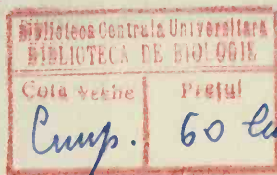
Fig. 246. — Evoluţia organismelor actuale după concepţia lui Woese (1981). Arhebacteriile, eubacteriile şi eucariotele (celula eucariotă originară) s-au format de la un strămoş comun (progenot), cu organizare mai simplă decît procariotele actuale. Eucariotele au apărut cînd urcariotele au devenit „gazde" pentru unele bacterii endosimbionte, care au format mitocondriile şi cloroplastele.

Apariţia eucariotelor. După concepţia lui Woese (1981), la baza evoluţiei organismelor eucariote a stat o categorie ipotetică de entităţi, denumite *Urkaryotes*, care s-au separat de celelalte linii de evoluţie într-un stadiu foarte precoce, probabil cu mult înainte de apariţia strămoşului bacteriilor actuale. Celula eucariotă primitivă— *Urkaryotes* — a luat naştere cu mult înainte de stabilirea cloroplastelor şi mitocondriilor, dar nu ca rezultat al unui proces evolutiv grefat pe procariote, ci direct de la progenot. Probabil că urcariotele au fost mai asemănătoare cu progenotul (de la care au evoluat) decît cu procariotele. Ulterior, urcariotele au evoluat independent, trecînd printr-o fază cu o complexitate comparabilă celei a bacteriilor actuale, pentru ca, în cele din urmă, acestea să devină gazdă pentru unele bacterii endosimbionte, care au format, prin evoluţie regresivă, mitocondriile şi cloroplastele. După Woese şi Gibson (1979), mitocondriile celulelor vegetale s-ar fi format ca o consecinţă a stabilirii endosimbiotice a unor bacterii fotosintetizante purpurii, iar cloroplastele pe seama unor cianobacterii (fig. 246). Unele asemănări la nivel molecular între eucariote şi arhebacterii (de exemplu, secvenţa aminoacizilor în proteina ribosomală A) nu exclud participarea acestora din urmă la formarea celulei eucariote.

În această concepţie, celula eucariotă este considerată ca o „himeră filogenetică" rezultată pe o cale diferită de cele două linii de descendenţă ancestrală, bacteriene.

Van Valen şi Maiorana (1980) consideră că arhebacteriile au evoluat divergent faţă de linia eubacteriană principală, într-o perioadă relativ recentă (dar nespecificată de autori). Caracterul lor unic s-ar datora, pe de o parte, pierderii unor proprietăţi ancestrale „procariote" (legate de compoziţia peretelui celular, a membranelor lipidice etc.) pe care le-au redobîndit ulterior, cu structură moleculară modificată, iar, pe de altă parte, unor modificări rapide ale aparatului de transcriere şi traducere genetică, determinate într-un mod încă misterios de presiunea selecţiei, exercitată într-o formă unică asupra acestei linii de descendenţă.

Conceptul de „*Archaebacteria*" bazat şi pe analiza secvenţei ARNr 16 S (18 S) demonstrează că unele microorganisme nu sînt filogenetic nici procariote, nici eucariote. Ele formează un nou regn primordial în istoria şi ordinea naturală a vieţii. Studiul lor a permis, pe lîngă stabilirea unor relaţii genealogice între microorganisme, deschiderea unor perspective noi pentru stabilirea unui sistem natural de clasificare a bacteriilor—ţelul final al sistematicii acestora—şi a stimulat cercetările de genetică moleculară şi biochimie comparată, ca şi pe cele de ecologie şi microbiologie aplicată.



BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

BALCH, W. E., FOX, G. E., MAGRUM, L. J., WOESE, C.R., WOLFE, R. S., 1979, *Methanogens: Reevaluation of a unique biological group.* Microbiol. Rev., **43**, 261–296.

BARBIERI, M., 1981, *The ribotype theory on the origin of life.* J. Theoret. Biol., **91**, 545–601.

BARGHOORN, S.E., 1971, *The oldest fossils.* Sci. Amer., **224**, 30–42.

BARRELL, B. G., BANKIER, A. Y., DROVIN, J., 1979 , *A different genetic code in human mitochondria.* Nature (London), **282**, 189–194.

BAYLEY, S. T., MORTON, R. A., 1978, *Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria.* Crit. Rev. Microbiol., **6**, 151–205.

BLANDINO, G., 1969, *Theories on the nature of life.* Philosophical Library, New York.

BOGORAD, L., 1975, *Evolution of organelles and eukaryotic genomes.* Science, **188**, 891–898.

BRADLEY, S. P. C., WINDLEY, B. F., 1975, *The search for protolife.* Proc. R. Soc. Lond., B, **189**, 213–233.

CALVIN, M., 1975, *Chemical evolution.* Amer. Sci., **63**, 169–177.

CAVALIER-SMITH, T., 1975, *The origin of nuclei and of eukaryotic cells.* Nature (London), **256**, 463–468.

CLEVELAND, L. R., GRIMSTONE, A. V., 1964, *The fine structure of the flagellate Myxotricha paradoxa and its associated microorganisms.* Proc. R. Soc. Lond., B, **157**, 668–683.

COHEN S. S., 1970, *Are/were mitochondria and chloroplasts microorganisms?* Amer. Sci., **58**, 281–289.

COHEN, S.S., 1973, *Mitochondria and chloroplasts revisited.* Amer. Sci., **61**, 437–445.

DE DUVE, C., 1975, *Origin of mitochondria.* Science, **182**, 85.

DICKERSON, R. E., 1978, *Chemical evolution and the origin of life.* Sci. Amer., **239**, 70–88.

DICKERSON, R. E., 1980, *Cytochrome c and the evolution of energy metabolism.* Sci. Amer., **242**, 136–153.

DODSON, E. O., 1979, *Crossing the prokaryote–eukaryote border: endosymbiosis of continuous development.* Canad. J. Microbiol., **25**, 652–673.

DOEMEL, N. W., BROCK, D.T., 1974, *Bacterial stromatolites: origin of laminations.* Science, **184**, 1083–1085.

DOOLITTLE, W. F., SAPIENZA, C., 1980, *Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution.* Nature (London), **284**, 601–603.

DOSE, K., 1983, *Prebiotic polypeptides and the origin of biological information.* Naturwisenschaften, **70**, 378–382.

EIGEN, M., 1971, *Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules.* Naturwissenschaften, **64**, 51–63.

EIGEN, M., GARDINER, W., SCHUSTER, P., WINKLER-OSWATITSCH, R., 1981, *The Origin of Genetic Information.* Sci Amer., **244**, 78–94.

FOX, S. W., 1973, *Origin of the cell: experiments and premises.* Naturwissenschaften, **60**, 359–368.

FOX S.W., 1974, *Origins of biological information and the genetic code.* Molecular and Cellular Biochemistry, **3**, 129–142.

FOX, S. W., 1975, *Looking forward to the present.* Biosystems, **6**, 165–175.

FOX, S. W., 1980, *Life from an orderly cosmos.* Naturwissenschaften, **67**, 576–581.

FOX, S.W., 1980, *The phylogeny of prokaryotes.* Science, **209**, 457–463.

GROVES, D. I., DUNLOP, J. S. R., BUICK, R., 1981, *An early habitat of life.* Sci. Amer., **244**, 56–65.

GRAY, M. W., DOOLITTLE, W. F., 1982, *Has the endosymbiont hypothesis been proven?* Microbiol. Rev., **46**, 1–42.

HALL, B.J., 1971, *Evolution of the prokaryotes*. J. Theoret. Biol., **30**, 429–459.

HARTMAN, H., 1975, *Speculations on the origin and evolution of metabolism*. J. Molec. Evol., **4**, 359–370.

HEDGES, R. W., 1972, *The pattern of evolutionary change in bacteria*. Heredity, **28**, 39–48.

HERDMAN, M., STANIER, R. Y., 1977, *The Cyanelle: chloroplast or endosymbiotic prokaryote*. FEMS Lett., **1**, 7–12.

KANDLER, O., 1981, *Archaebacterien und Phylogenie der Organismen*. Naturwissenschaften, **68**, 183–192.

KISS, S., 1983, *Arhebacteriile și cronologia evoluției chimice și organice*. În Simpozionul „Evoluție și adaptare", Cluj-Napoca, p. 83–109.

LAMPEN, J. O., 1965, *Secretion of enzymes by microorganisms*. Symposium of the Society for General Microbiology. XV. „Structure and Function in microorganisms", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 115–133.

LEWIN, R. A., 1981, *Prochloron and the theory of symbiogenesis*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **361**, 325–328.

MARGULIS, L., 1968, *Evolutionary criteria in Thallophytes: a radical alternative*. Science, **161**, 1 020–1 022.

MARGULIS, L., 1971, *The origin of plant and animal cells*. Amer. Sci., **59**, 230–235.

MARGULIS, L., 1971, *Symbiosis and evolution*. Sci Amer., **225**, 49–58.

MARGULIS, L., 1975, *The microbes contribution to evolution*. În *Biosystems*. North Holland Publ. Co., Amsterdam.

MARGULIS, L., CHASE, D., TO, L.P., 1979, *Possible evolutionary significance of spirochaetes*. Proc. R. Soc. Lond., B, **204**, 185–198.

MONOD, J., 1971, *Le hasard et la nécessité. Essai sur la philosophie de la biologie moléculaire*. Senil, Paris.

MUNJAL, D., NICKERSON, P. A., 1973, *Have mitochondria arisen from endosymbiotic microorganism?* J. Sci. Ind. Res., **32**, 70–77.

OPARIN, A. I., GLADILIN, K. L., 1980, *Evolution of self-assembly of Probionts*. Biosystems, **12**, 133–145.

ORGEL, L. E., 1973, *The origin of life and the evolution of macromolecules*. Folia Biologica, **29**, 65–78.

PFLUG, H. D., 1982, *Early diversification of life in Archaean*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., C_3, 53–64.

PALADE, G. E., 1966, *The organization of living matter*. În *The scientific endeavour*. Rockefeller Univ. Press, New York.

PRICE, C.C., 1971, *Some philosophical implications of evolution and the origin and synthesis of life*. Perspectives in Biology and Medicine, The University of Chicago, p. 396–409.

PONNAMPERUNA, C., GABEL, N. W., 1974, *The precellular evolution and organization of molecules*. Symposium of the Society for General Microbiology. XXIV. „Evolution in the Microbial World", Cambridge Univ. Press, Londra, p. 393–415.

QUAYLE, R. J., FERENCI, T.H., 1978, *Evolutionary aspects of autotrophy*. Microbiol. Rev., **42**, 251–273.

RAFF, A.R., MAHLER, M.R., 1972, *The non symbiotic origin of mitochondria*. Science, **177**, 575–582

RAVEN, H. P., 1970, *A multiple origin for plastids and mitochondria*. Science, **169**, 641–646.

REIJNDERS, L., 1975, *The Origin of mitochondria*. J. Molec. Evol., **5**, 167–176.

RILEY, M., ANILIONIS, A., 1978, *Evolution of the bacterial genome*. Ann. Rev. Microbiol., **32**, 519–560.

SCHOPF, W. J., EHLERS, E. G., STILES, D. V., BIRLE, J. D., 1965, *Fossil iron Bacteria preserved in pyrite*. Proceed. Amer. Philos. Soc., **109**, 288–308.

SCHOPF, W. J., 1970, *Precambrian microorganism and evolutionary events prior to the origin of vascular plants*. Biol. Rev., **45**, 319–352.

SCHOPE, W. J., 1975, *The age of microscopic algae*. Endeavour, **122**, 51–57.

SCHOPF, W. J., 1978, *The evolution of the earliest cells*. Sci Amer., **239**, 85–102.

SCHWARTZ, A. W., 1983, *Chemical evolution: the first stages*. Naturwissenschaften, **70**, 373–377.

SONEA, S., 1972, *Bacterial plasmids instrumental in the origin of eukaryotes?* Rev. Canad. Biol., **31**, 61–63.

STANIER, R. Y., 1970, *Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance*. Symposium of the Society for General Microbiology, XX, „Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells". Cambridge Univ. Press, Londra, p. 1–38.

STANIER, R. Y., 1974, *The origins of photosynthesis in eukaryotes*. Symposium of the 24th Society for General Microbiology, Evolution in the microbial world" Cambridge Univ. Press, Londra, p. 219–242.

TAYLOR, I. J. R., 1974, *Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory for the origin of eukaryotes*. Taxon, **23**, 229–258.
TAI, TE, W. U., 1978, *Experimental evolution in bacteria*. CRC Critical Reviews in Microbiology, p. 33–51.
THOMAS, J. D., 1967, *Biogenèse (Colloque sur les sistèmes biologiques élémentaires et la biogenèse)*. Masson, Paris.
UZELL, T., SPOSSKY, C., 1974, *Mitochondria and plastids as endosymbionts? a revival of special creation*. Amer. Sci., **62**, 334–343.
VAN VALEN, L. M., MAIORANA, V. C., 1980, *The Archaebacteria and eukaryotic origins*. Nature (London), **287**, 248–250.
WALD, G., 1966, *The origins of life*. În *The scientific endeavour*. Rockefeller Univ. Press, New York.
WALLACE, D. C., MOROWITZ, H. J., 1973, *Genome size and evolution*. Chromosoma, **40**, 121–126.
WILSON, A. C., CARLSON, S. S., WHITE, T. J., 1977, *Biochemical evolution*. Ann. Rev. Biochem., **46**, 573–639.
WOESE, C. R., 1975, *A proposal concerning the origin of life on the planet Earth*. J. Molec. Evol., **13**, 95–101.
WOESE, C. R., FOX, G. E., ZABLEN, L., UCHIDA, T., BONEN, L., PECHMAN, K., LEWIS, B. J., STAAL, D., 1975, *Conservation of primary structure in 16 S ribosomal RNA*. Nature (London), **254**, 83–85.
WOESE, C. R., 1977, *Endosymbionts and mitocondrial origins*. J. Molec. Evol., **10**, 93–96.
WOESE, C. R., FOX, G. E., 1977, *The concept of cellular evolution*. J. Molec. Evol., **10**, 1–6.
WOESE, C. R, FOX, G. E., 1977, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc. Nat. Acad. Sci., S.U.A., **74**, 5 088–5 090.
WOESE, C.R., 1981, *Archaebacteria*. Sci. Amer., **244**, 94–106.
WOESE, C. R., GUPTA, R., 1981, *Archaebacteria merely derived „prokaryotes"?*, Nature (London), **289**, 95–96.
WOESE, C. R., 1982, *Archaebacteria and cellular origins: an overview*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., C_3, 1–17.
ZEIKUS, J. G., 1977, *The biology of methanogenetic bacteria*. Bacteriol. Rev., **41**, 514–541.
ZUCKERKAN DLE., PAULING, L., 1965, *Molecules as documents of evolutionary history*. J. Theoret. Biol., **8**, 357–366.

Redactor: ECATERINA GHICA
Tehnoredactor: MAGDALENA IACOB

Bun de tipar 14.XII.1984. Format 16/70×100. Coli de tipar 29,75. Planşe 64. C.Z. pentru biblioteci mari şi mici: 5768(021) = 59


I.P. „Informaţia"
str. Brezoianu nr. 23–25.
Bucureşti